

**UNIVERZITA KARLOVA
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA**

Molekulární a buněčná biologie, genetika a virologie



Mgr. Martina Hálová

Role sestřihových faktorů v regulaci genové exprese – vztah sestřihu
a transkripce v *Saccharomyces cerevisiae*

Splicing Factors in the Regulation of Gene Expression - the Relationship
Between Splicing and Transcription in *Saccharomyces cerevisiae*

DISERTAČNÍ PRÁCE

Školitel: Doc. RNDr. Petr Folk, CSc.

Konzultant: Doc. RNDr. František Půta, CSc.

Praha 2019

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem disertační práci zpracovala samostatně, na základě konzultací se svým školitelem, a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla použita k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne 2.5.2019

Martina Hálová

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala především svému školiteli, doc. RNDr. Petru Folkovi, CSc. a svému konzultantovi doc. RNDr. Františku Půtovi, CSc., za odborné vedení v průběhu více než deseti let spolupráce. Můj neutuchající dík patří rovněž Mgr. Kateřině Abrahámové, Ph.D., RNDr. Anně Valentové a RNDr. Ondřeji Gahurovi, Ph.D., kteří nejenže byli autory některých výsledků popsanych v této práci, které jsem pak mohla rozpracovat, ale byli i trpělivými učiteli při mých prvních kontaktech s molekulární biologii. Ostatním členům laboratoře (a že se jich v průběhu let vystřídalo hodně) děkuji za vytvoření kamarádského kolektivu a skvělého pracovního prostředí. Speciální poděkování patří rovněž laborantce paní Evě Krellerové, která umí konat zázraky na počkání.

V neposlední řadě bych chtěla poděkovat také své rodině a Tomášovi za neutuchající všestrannou podporu, jejíž vrchovatou měrou mě v průběhu celého studia zahrnovali, čímž mi pomohli překonat veškerá úskalí, které doktorské studium obnáší.

Finanční podpora

Tato práce vznikla za finanční podpory Grantové agentury České republiky (GAČR 14-19002S) a Grantové agentury Univerzity Karlovy (GAUK441711 a GAUK8214).

Obsah

| | |
|---|----|
| Obsah | 4 |
| Abstrakt..... | 8 |
| Abstract..... | 9 |
| Seznam zkratek | 10 |
| 1. Úvod..... | 12 |
| 2. Literární přehled | 13 |
| 2.1. Sestřih pre-mRNA | 13 |
| 2.1.1. Formování spliceosomu a průběh sestřihové reakce..... | 14 |
| 2.1.2. Modely kotranskripčního sestřihu..... | 16 |
| 2.2. Chromatin a transkripce | 18 |
| 2.2.1. Lokální struktura chromatinu jako klíčový faktor ovlivňující transkripci a související procesy | 18 |
| 2.2.2. Histonové modifikace | 20 |
| 2.2.3. Histonová varianta H2A.Z | 25 |
| 2.3. Chromatin a kotranskripční sestřih..... | 28 |
| 2.3.1. Sestřih a ubiquitylace H2BK123..... | 28 |
| 2.3.2. Sestřih a acetylace histonů | 29 |
| 2.3.3. Sestřih a histonová varianta H2A.Z | 30 |
| 2.4. Proteiny SNW | 31 |
| 2.4.1. Lidský ortholog SKIP | 31 |
| 2.4.2. Kvasinkový ortholog Prp45 | 33 |
| 3. Cíle práce | 38 |
| 4. Materiál a metody | 39 |
| 4.1. Materiál..... | 39 |
| 4.1.1. Použité kmeny | 39 |
| 4.1.2. Kultivační média a roztoky | 50 |
| 4.1.3. Přehled použitých primerů | 52 |
| 4.1.4. Použité protilátky | 55 |
| 4.1.5. Použité soupravy pro manipulaci s nukleovými kyselinami..... | 55 |
| 4.1.6. Použité velikostní standardy | 55 |
| 4.1.7. Reakční směsi a programy PCR..... | 56 |

| | | |
|---------|---|----|
| 4.2. | Metody..... | 57 |
| 4.2.1. | Kultivace kvasinkových kmenů | 57 |
| 4.2.2. | Měření růstové křivky pomocí přístroje Varioskan | 57 |
| 4.2.3. | Fosfátové přenosy | 58 |
| 4.2.4. | Kapkový test..... | 58 |
| 4.2.5. | Příprava glycerolových konzerv a jejich výsev | 59 |
| 4.2.6. | Křížení, sporulace a mikromanipulace spor..... | 59 |
| 4.2.7. | Transformace kvasinek lithium-acetátovou metodou | 59 |
| 4.2.8. | Transformace <i>E. coli</i> elektroporací | 60 |
| 4.2.9. | Příprava proteinových extraktů | 61 |
| 4.2.10. | Tris-glycinová SDS-PAGE s využitím soupravy Bio-Rad Mini Protean II/III Cell..... | 62 |
| 4.2.11. | Western blot | 64 |
| 4.2.12. | Imunodetekce proteinů na membráně | 65 |
| 4.2.13. | Izolace chromozomální DNA z kvasinek | 66 |
| 4.2.14. | Izolace plazmidové DNA alkalickou metodou - “midiprep” | 66 |
| 4.2.15. | Izolace plazmidové DNA alkalickou metodou - “miniprep” | 67 |
| 4.2.16. | Extrakce DNA pro aplikace PCR pomocí LiAc/SDS | 68 |
| 4.2.17. | Izolace celkové RNA z kvasinek | 69 |
| 4.2.18. | Reverzní transkripce..... | 71 |
| 4.2.19. | Izolace DNA polymeráz..... | 71 |
| 4.2.20. | Amplifikace DNA pomocí PCR..... | 72 |
| 4.2.21. | Elektroforetická analýza DNA v agarózovém gelu | 74 |
| 4.2.22. | Přečištění DNA pomocí NucleoSpin® Extract II (Macherey-Nagel) 75 | |
| 4.2.23. | Štěpení DNA restrikčními endonukleázami..... | 76 |
| 4.2.24. | Kvantitativní PCR (qPCR)..... | 76 |
| 4.2.25. | Chromatinová imunoprecipitace | 77 |
| 5. | Výsledky | 81 |
| 5.1. | Prp45 a sestřih pre-mRNA | 81 |
| 5.1.1. | Buňky <i>prp45</i> (1-169) akumulují pre-mRNA | 81 |
| 5.1.2. | Akumulace pre-mRNA u buněk <i>prp45</i> (1-169) není způsobena defektem v degradačních drahách..... | 82 |

| | | |
|--------|--|-----|
| 5.1.3. | Snížená efektivita sestřihu u buněk <i>prp45(1-169)</i> není závislá na kánonicitě 5' sestřihového místa nebo místa větvení | 86 |
| 5.1.4. | Mutace <i>prp45(1-169)</i> způsobuje defekty v kotranskripčním sestavování spliceosomu..... | 89 |
| 5.2. | Prp45 a regulace transkripce | 92 |
| 5.2.1. | Úvod..... | 92 |
| 5.2.2. | Diferenciální interakce na úrovni indukce <i>PHO5</i> mezi <i>prp45(1-169)</i> a delečními alelami vybraných elongačních faktorů a modifikátorů chromatinu . | 95 |
| 5.2.3. | Delece genů pro regulátory elongace transkripce a efekторы chromatinových modifikací neprohlubují sestřihový fenotyp buněk <i>prp45(1-169)</i> | 98 |
| 5.2.4. | SGA..... | 100 |
| 5.2.5. | Alela <i>prp45(1-169)</i> vykazuje silnou negativní syntetickou interakci s delečními alelami genů kódujících komponenty komplexu SWR1 a <i>HTZ1</i> | 104 |
| 5.2.6. | Alela <i>prp45(1-169)</i> nemění relativní expresi ani relativní účinnost sestřihu intronických genů vázajících Htz1 | 106 |
| 5.2.7. | Mutanty <i>prp45(1-247)</i> a <i>prp45(1-330)</i> | 108 |
| 6. | Diskuse..... | 115 |
| 6.1. | Mutace Prp45 - zkracování interakční platformy | 115 |
| 6.2. | Prp45 a sestřih pre-mRNA | 116 |
| 6.2.1. | Prp45 působí ještě před svojí stabilní inkorporací do spliceosomu | 117 |
| 6.2.2. | Hypotézy vysvětlující opožděné vyvazování U2 snRNP..... | 118 |
| 6.2.3. | Vyvazování a disociace U1 snRNP nejsou u buněk <i>prp45(1-169)</i> ovlivněny | 120 |
| 6.2.4. | Sestřih v buňkách <i>prp45(1-169)</i> probíhá posttranskripčně..... | 121 |
| 6.3. | Prp45 a transkripce | 122 |
| 6.3.1. | Genetické interakce a interakce na úrovni indukce <i>PHO5</i> | 122 |
| 6.3.2. | Dereprese genu <i>PHO5</i> v neindukčních podmínkách | 124 |
| 6.3.3. | Alela <i>prp45(1-169)</i> , deleční alely genů souvisejících s transkripcí a modifikacemi chromatinu a sestřih pre-mRNA..... | 125 |
| 6.3.4. | SGA a genetické interakce mezi alelami <i>prp45</i> a <i>htz1Δ</i> | 127 |
| 6.4. | Spřahuje Prp45 sestřih s transkripcí? | 128 |
| 6.4.1. | Výsledky - rekapitulace..... | 129 |
| 6.4.2. | Hypotézy o mechanismu spřažení sestřihu a transkripce prostřednictvím Prp45..... | 130 |

| | | |
|-----|-------------------------|-----|
| 7. | Závěr | 132 |
| 8. | Seznam publikací | 133 |
| 9. | Přehled literatury..... | 134 |
| 10. | Příloha..... | 152 |

Abstrakt

Transkripce a úpravy primárního transkriptu jako například sestřih pre-mRNA probíhají na chromatinu ve stejný čas a na stejném místě. Tento fakt vedl k myšlence, že jsou tyto procesy regulačně spřaženy, o čemž svědčí i stále přibývajících množství důkazů. Jedním z faktorů, který by toto spřažení mohl zprostředkovat, je protein Prp45/SKIP. O lidském proteinu SKIP je známo, že se účastní vzniku mRNA na úrovni iniciace i elongace transkripce, interaguje s modifikátory chromatinu a je to i známý sestřihový faktor. Funkce orthologa proteinu SKIP z kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*, Prp45, byla však zatím spojena pouze se sestřihem pre-mRNA.

V této práci jsme blíže charakterizovali roli Prp45 při sestřihu a také jsme rozpracovali výsledky spojující Prp45 s transkripcí a modifikacemi chromatinu. Na základě výsledků získaných metodou RNA-seq bylo zjištěno, že buňky *prp45(1-169)* akumulují pre-mRNA. Tato akumulace zřejmě není způsobená poškozením drah regulujících degradaci RNA. Rozsah defektů sestřihu u buněk *prp45(1-169)* také nebyl závislý na kánonicitě 5' sestřihového místa, místa větvení nebo vzdálenosti mezi místem větvení a 3' sestřihovým místem. Pomocí chromatinové imunoprecipitace jsme zjistili, že mutace *prp45(1-169)* způsobuje defekt při sestavování spliceosomu, a to ve fázi vyvazování U2 snRNP, které je zpožděné. Toto zpoždění se pak přenáší do dalších fází sestavování spliceosomu, kdy kotranskripční vyvazování U5 snRNP a komplexu NTC je už téměř nedetekovatelné. Vzhledem k tomu, že hladiny mRNA klesaly u mutovaných buněk jen mírně, máme za to, že sestřih stále probíhá, i když posttranskripčně a tedy pravděpodobně méně účinně.

Na spojení Prp45 s transkripcí ukazuje pozorování, že u buněk *prp45(1-169)* dochází ke zpožděné indukci genů, které neobsahují intron. Příkladem jsou geny fosfátového metabolismu. Metodou SGA jsme také pozorovali genetické interakce s mnoha delečními alelami genů, které kódují proteiny účastnící se elongace transkripce a zprostředkovávající modifikace chromatinu. Nejsilnější genetické interakce jsme našli s delečními alelami genů kódujících histonovou variantu H2A.Z a komponenty komplexu SWR1, který zprostředkuje vyvazování H2A.Z na chromatin. Funkční souvislost mezi Prp45 a H2A.Z jsme charakterizovali pomocí nově připravených mutantů, *prp45(1-247)* a *prp45(1-330)*.

Hypotézy o tom, jakým způsobem by Prp45 mohl spřahovat sestřih s modifikacemi chromatinu a transkripcí jsou diskutovány v závěru práce.

Abstract

Transcription and pre-mRNA processing, e.g., splicing, occur at the same place and time in the context of chromatin. A growing amount of evidence supports the hypothesis that these processes are interconnected. Prp45/SKIP is one of the factors which are believed to mediate the interconnection. The human ortholog, SKIP, is known for affecting mRNA formation on the levels of transcription initiation and elongation. Moreover, it interacts with chromatin modifiers and it is a splicing factor, too. The function of the *Saccharomyces cerevisiae* ortholog, Prp45, has been so far connected only to pre-mRNA splicing.

In this work, we characterized the role of Prp45 in splicing and elaborated the results connecting Prp45 to transcription and chromatin modifications. RNA-seq results showed that pre-mRNA is accumulated in *prp45*(1-169) cells. This accumulation is not caused by the reduced activity of pathways responsible for RNA degradation. The extent of the splicing inefficiency in *prp45*(1-169) cells did not depend on either the canonicity of the 5' splice site and branch site or the distance between the branch site and the 3' splice site. Using chromatin immunoprecipitation, we found that *prp45*(1-169) mutation causes delay in U2 snRNP recruitment to assembling spliceosome. This delay transfers to the later phases of spliceosome assembly rendering the cotranscriptional recruitment of U5 snRNP and NTC complex almost undetectable. mRNA levels in the mutant cells are only marginally affected. Therefore, we suppose shift towards the posttranscriptional splicing, which makes splicing reaction less efficient.

We have observed that *prp45*(1-169) delays transcriptional induction of intronless genes, e.g., genes of phosphate metabolism. Based on Synthetic genetic array (SGA) results, *PRP45* genetically interacts with many genes encoding proteins involved in transcription elongation and chromatin modifications. The strongest interactions were found with genes coding histone variant H2A.Z and SWR1 complex components which load H2A.Z to chromatin. We analyzed the functional relationship between Prp45 and H2A.Z with the help of novel mutant alleles, *prp45*(1-247) and *prp45*(1-330).

Hypotheses are discussed about the function of Prp45 in interconnection of splicing, chromatin modifications and transcription.

Seznam zkratek

| | |
|-----------------|--|
| AA/ BIS | směs akrylamidu a N,N'-metylenbisakrylamidu |
| APS | persíran amonný ("ammonium persulfate") |
| ATP | adenosintrifosfát |
| BBP | protein vázající místo větvení ("Branch Point Binding Protein") |
| bp | pár bází ("Base Pair") |
| BSA | bovinní sérový albumin |
| cDNA | komplementární DNA |
| COMPASS | komplex proteinů asociovaných se Set1 ("Complex of Proteins Associated with Set1") |
| CTD | C-terminální doména RNA polymerázy II |
| DEPC | diethylpyrokarbonát |
| DNA | deoxyribonukleová kyselina |
| dNTP | deoxyribonukleotidtrifosát (směs dATP, dCTP, dTTP a dUTP) |
| DSIF | "DRB-sensitivity Inducing Factor" |
| DTT | dithiothreitol |
| EDTA | ethylendiamintetraoctová kyselina |
| FACT | komplex FACT ("Facilitates Chromatin Transcription") |
| 5-FOA | 5-fluoroorotová kyselina |
| HA | hemaglutinin |
| NMD | „histone modification domain“ |
| H2BK123 | lysin 123 histonu H2B |
| H3K4 | lysin 4 histonu H3 |
| H3K36 | lysin 36 histonu H3 |
| H3K56ac | acetylace lysinu 56 histonu H3 |
| H3K79 | lysin 79 histonu H3 |
| ChIP | chromatinová imunoprecipitace |
| ChIP-seq | chromatinová imunoprecipitace spojená se sekvenováním |
| IPTG | isopropylthiogalaktosid |
| kDa | kilodalton |

| | |
|--------------------|--|
| LLPS | fázový přechod liquid-liquid (“Liquid-liquid Phase Separation”) |
| mRNA | mediátorová RNA (“messenger RNA”) |
| NELF | “Negative Elongation Factor” |
| NFR | oblast bez nukleosomů (“Nucleosome Free Region”) |
| NTC | komplex proteinů asociovaných s Prp45 (“Nineteen Complex”) |
| NTR | komplex proteinů příbuzných s NTC (“Nineteen-related Complex”) |
| OD | optická densita |
| PCR | polymerázová řetězová reakce |
| PE | polyethylen |
| PEG | polyethylenglykol |
| PIC | preiniciační komplex (“Preinitiation Complex”) |
| pre-mRNA | prekurzorová mediátorová RNA (“precursor messenger RNA”) |
| P-TEFb | pozitivní transkripční elongační faktor b |
| qPCR | kvantitativní PCR |
| RES | “Retention and Splicing Complex” |
| RNA | ribonukleová kyselina |
| RNA Pol II | RNA polymeráza II |
| RNA-seq | metoda sekvenování RNA |
| SAGA | “Spt-Ada-Gcn acetyltransferase” |
| SALSA/ SLIK | “SAGA-altered, Spt8 absent/ SAGA-like” |
| SDS | dodecylsulfát sodný |
| SGA | “Synthetic Genetic Array” |
| snRNP | malá jaderná ribonukleoproteinová partikule |
| ssDNA | DNA z mličky lososa (“Salmon Sperm DNA”) |
| TAD | topologicky asociující domény (“topologically associating domains”) |
| TAR | element působící aktivaci <i>in trans</i> (“ <i>trans</i> -activation Response Element”) |
| TEMED | tetramethylethylendiamin |
| VDR | receptor vitamínu D (“Vitamin D Receptor”) |
| wt | divoký typ (“Wild Type”) |

1. Úvod

Pekařská kvasinka *Saccharomyces cerevisiae* je jeden z nejčastěji používaných modelových organismů v molekulární biologii. Jeho použití má mnohé výhody, ať už z praktických nebo vědeckých důvodů. Mezi praktické důvody patří rychlý růst a levná kultivace, nepatogenita a také snadná příprava mutací díky vysoké frekvenci homologní rekombinace. Experimentální práci velmi usnadňuje i existence přirozených kvasinkových plazmidů, které lze využít ve výzkumu.

Mezi vědecké důvody patří to, že jde o eukaryotický organismus, který má méně úrovní komplexity než vyšší eukaryota. Například pro výzkum sestřihu je kvasinka oblíbeným modelem, protože u ní prakticky neexistuje alternativní sestřih. Tomu odpovídá i fakt, že má oproti lidským buňkám asi jen polovinu proteinů, ale všechny lze najít i u savců (Fabrizio et al. 2009). Ty proteiny, které mají savci navíc, jsou důležité právě pro alternativní sestřih. Kvasinkový spliceosom je proto považován za základní stav, minimální jádro, s jehož pomocí je možné odhalit základní mechanismus sestřihového procesu, který lze uplatnit také u vyšších eukaryot.

Narozdíl od původních představ z minulého století, je nutné si uvědomit, že transkripce a úpravy primárního transkriptu, jako například sestřih pre-mRNA, nejsou izolované procesy, ale probíhají ve stejnou dobu a na stejném místě a mohou se tedy vzájemně regulačně ovlivňovat. Předpokladem je existence faktorů, které působí na pomezí těchto procesů a které jsou schopné toto regulační spřažení zprostředkovat. Transkripce navíc neprobíhá na holé DNA, ale na DNA v kontextu chromatinu. Histonové modifikace představují další regulační úroveň, která je zatím poznána jen nedostatečně. K poznání o vzájemných vztazích mezi transkripcí, sestřihem a stavem chromatinu se snaží přispět i tato práce.

2. Literární přehled

2.1. Sestřih pre-mRNA

V genomu většiny eukaryotických organismů jsou kódující sekvence, exony, přerušovány nekódujícími sekvencemi, introny. Během vzniku mRNA musejí být introny odstraněny a exony spojeny dohromady. Tento proces se nazývá sestřihem pre-mRNA a je katalyzován velmi dynamickým ribonukleoproteinovým komplexem zvaným spliceosom.

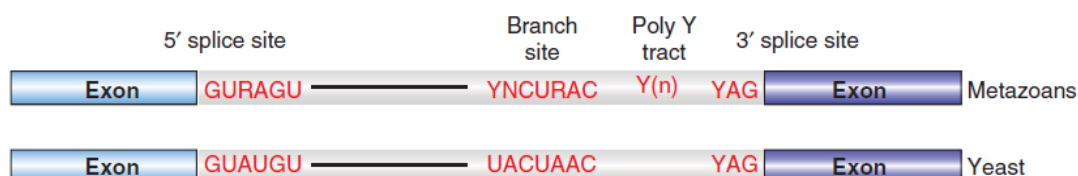
Z hlediska studia sestřihu má kvasinka *S. cerevisiae* výsadní postavení. Na rozdíl od savců, u kterých jeden gen obsahuje více intronů (Deutsch & Long 1999), se v průběhu evoluce stal z *S. cerevisiae* na introny chudý organismus. Intron, typicky pouze jeden, obsahuje jen asi 5 % genů (Deutsch & Long 1999; Spingola et al. 1999). Zajímavý je však fakt, že introny se zachovaly v genech, které jsou silně exprimovány, jako například v genech pro ribosomální proteiny nebo v genech kódujících komponenty cytoskeletu. Ve výsledku tedy sestřihu podléhá asi $\frac{1}{3}$ všech transkriptů (Ares et al. 1999). Kvasinky se od savců také odlišují délkou intronů a exonů. Introny jsou u kvasinky umístěny typicky na začátku genů. Délka exonu 1 se prakticky počítá na jednotky až nízké desítky nukleotidů. Medián délky exonů 2 je potom 434 nukleotidů (Tardiff et al. 2006) a průměrná délka intronu je 256 nukleotidů (Kupfer et al. 2004). Poměr délek intronů a exonů je u savců opačný. Délka intronů se u savců pohybuje v rozpětí od několika set do několika tisíc nukleotidů (Deutsch & Long 1999), zatímco délka exonů je poměrně fixní, a to asi 120 nukleotidů (Ast 2004). Vzhledem k přítomnosti prakticky jen jednoho intronu v kvasinkových genech u *S. cerevisiae* téměř neexistuje, na rozdíl od savců, alternativní sestřih. Jak bude podrobněji popsáno dále, spliceosom kvasinek obsahuje jen asi polovinu proteinů oproti savčím buňkám, ale téměř všechny kvasničné komponenty mají svého protějška u savců (Fabrizio et al. 2009). Funkce proteinů, které má savčí spliceosom navíc, souvisí právě s regulací alternativního sestřihu. Na kvasinkový spliceosom je proto nahlíženo jako na jakýsi “základní stav”, minimální kóre nezbytné pro sestřih. Kvasinka je proto ideální organismus pro pochopení základních mechanismů regulace sestřihu pre-mRNA

Introny jsou definovány několika krátkými sekvencemi (Obr. 1a, shrnuto ve (Will & Luhrmann 2010)). Těmito sekvencemi jsou 5' sestřihové místo (konsensus sekvence *S. cerevisiae* je GUAUGU) a místo větvení (“branch point”, consensus sekvence *S. cerevisiae* je UACUAAC, vlastní místo větvení je podtrženo). 3' sestřihové místo je definováno jen dvěma nukleotidy, AG, a spliceosom ho vybírá v závislosti na efektivní vzdálenosti od místa větvení (Pérez-Valle & Vilardell 2012). U vyšších eukaryot se ještě mezi místem větvení a 3' sestřihovým místem nachází polypyrimidinová oblast. U *S. cerevisiae* se oblast bohatá na pyrimidiny nachází před místem větvení. Zatímco u *S. cerevisiae* jsou sekvence dobře konzervované, u metazoi je stupeň konzervovanosti nižší.

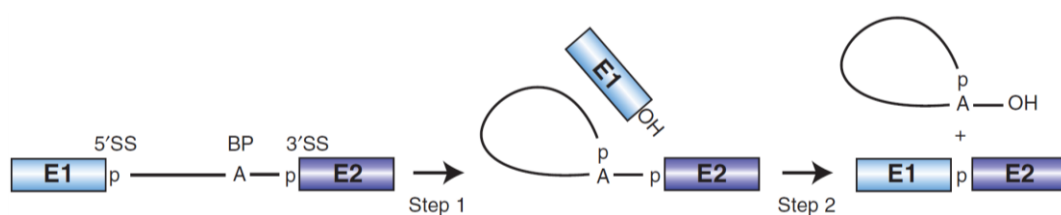
Sestřih probíhá dvěma následnými transesterifikačními reakcemi (Obr. 1b). Během prvního kroku dochází k nukleofilnímu ataku 2'OH skupiny adenosinu tvořícího

místo větvení (“branch site”) na fosfátovou skupinu guanosinu 5’ sestřihového místa. Tím dochází ke vzniku struktury zvané lariát-exon 2 a k uvolnění 3’OH skupiny exonu 1. V následujícím kroku dochází k nukleofilnímu ataku 3’OH skupiny exonu 1 na fosfát, který je součástí prvního nukleotidu exonu 2. Výsledkem této reakce a zároveň celého sestřihového procesu jsou spojené exony a intron uvolněný ve formě lariátu, který je následně linearizován a degradován.

a)



b)



Obr. 1. Konsensus sekvence definující intron a schéma dvou kroků sestřihu. Převzato z (Will & Luhrmann 2010).

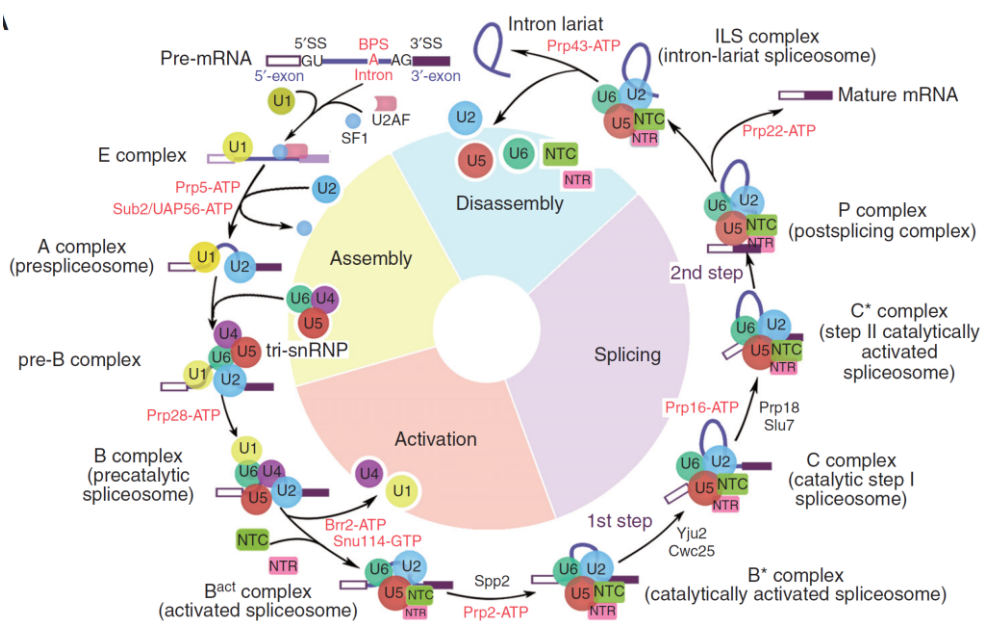
2.1.1. Formování spliceosomu a průběh sestřihové reakce

Spliceosom sestává z pěti snRNA (“small nuclear RNA”, malých jaderných RNA) označovaných jako U1, U2, U4, U5 a U6 a asi ~90 proteinů u *S. cerevisiae* a ~170 proteinů u člověka (Fabrizio et al. 2009; Will & Luhrmann 2010).

K vlastní sestřihové reakci není potřeba ATP, součástí spliceosomu je však osm ATPáz. Jde o RNA helicázy z rodin DEAD, Ski2-like a DEAH a jsou to Prp5, Sub5, Prp28, Brr2, Prp2, Prp16, Prp22 a Prp43. Energie v podobě ATP je využívána k přestavbám interakcí mezi RNA a RNA a RNA a proteiny. Současná představa je taková, že proteiny nastavují 5’ a 3’ sestřihová místa a místo větvení do správné pozice vůči sobě, což umožňuje katalýzu. Kromě participace při přestavbách spliceosomu při sestřihu optimálních substrátů se některé z těchto helicáz podílejí i na zvyšování specifity sestřihu tím, že pomáhají ze sestřihové reakce vylučovat suboptimální substráty (shrnutí například v (Koodathingal & Staley 2013; Cordin et al. 2012)).

Spliceosom je formován postupně, jak znázorňuje obrázek 2. Nejprve se na 5’ sestřihové místo váže U1 snRNP (“small nuclear ribonucleoprotein”, malá jaderná ribonukleoproteinová partikule; (Mount et al. 1983; Séraphin et al. 1988; Abovich et al. 1994; Berglund et al. 1997)). Experimenty založené na propojení komponent pomocí UV záření (“UV crosslinking”) ukázaly, že nejsilněji se U1 snRNP váže 17 nukleotidů od 5’ sestřihového místa (Baejen et al. 2014). To naznačuje, že se na vazbě podílejí i proteinové

komponenty U1 snRNP, ne pouze interakce U1 snRNA-5' sestřihové místo. Místo větvení je rozpoznáváno heterodimerem Msl5/Mud2 (na obrázku SF1/U2AF), který je někdy označován jako komplex “commitment” ((Mount et al. 1983; Séraphin et al. 1988; Abovich et al. 1994; Berglund et al. 1997). Experimenty metodou “UV crosslinking” ukázaly, že protein Msl5 se nejsilněji váže na místo větvení (odtud i jeho alternativní název BBP - “branch point binding protein”), zatímco signál Mud2 byl nejsilnější asi 15 nukleotidů za místem větvení (Baejen et al. 2014). To odpovídá tomu, že Mud2 je považován za lidského homologa proteinu U2AF65, který se váže na polypyrimidinovou oblast (Mackereth et al. 2011). pre-mRNA s navázanou partikulí U1 snRNP a heterodimerem Msl5/Mud2 se nazývá komplex E. Heterodimer Msl5/Mud2 je následně uvolněn a na místo větvení se váže partikule U2 snRNP, čímž je vytvořen komplex A neboli prespliceosom. Ke komplexu A se dále váže partikule tri-snRNP, která je tvořena U4/U6-U5 snRNP a která byla zformována zvláště (Nguyen et al. 2016). Tímto krokem vzniká komplex pre-B a následně prekatalytický spliceosom neboli komplex B. Dále dochází k uvolnění U1 a U4 snRNP a k vazbě dalších komplexů jako NTC (“Nineteen complex”), NTR (“Nineteen-related complex”) a RES (“Retention and splicing complex”), což dává vzniknout aktivovanému komplexu B (B^{act}) (Fabrizio et al. 2009). V rámci tohoto komplexu dochází k dalším přestavbám a výsledkem je katalyticky aktivní spliceosom označovaný také jako B^* , který katalyzuje první krok sestřihu. Po proběhnutí prvního kroku sestřihu je spliceosom opět přestavěn, vzniká komplex C a následně C^* katalyzující druhý krok sestřihu, který dává vzniknout komplexu P neboli postsestřihovému komplexu. Spliceosom poté zůstává navázaný na vyštěpeném intronu ve formě lariátu (ILS komplex). Poté se spliceosom rozpadá a jednotlivé komponenty mohou být recyklovány a využity pro další kolo sestřihu.



Obr. 2 Schéma dynamických přestaveb spliceosomu v průběhu sestřihové reakce. Převzato z (Yan et al. 2019).

2.1.2. Modely kotranskripčního sestřihu

V dnešní době se už bere jako fakt, že sestřih probíhá kotranskripčně, tedy na RNA, jejíž přepis RNA polymerázou II (RNA Pol II) ještě nebyl ukončen. Spliceosom se začíná formovat, jakmile je přepsána sekvence 5' sestřihového místa (Kotovic et al. 2003; Görnemann et al. 2005). Pomocí dvou nezávislých metod založených na sekvenování vznikající RNA byly první dokončené sestřihové události u *S. cerevisiae* detekovány, když byla RNA Pol II 26-27 nukleotidů za 3' sestřihovým místem. Plně dokončený sestřih všech transkriptů daného genu byl pozorován, když byla RNA Pol II ~133 nukleotidů za 3' sestřihovým místem (Carrillo Oesterreich et al. 2016a). Zajímavé jsou také prostorové vztahy mezi RNA Pol II a spliceosomem. Strukturní studie ukázaly, že asi 15 nukleotidů vznikající RNA je ukryto ve výstupním kanále RNA Pol II (Martinez-Rucobo et al. 2015). Z biochemických studií bylo dovozeno, že spliceosom zakrývá asi 9 nukleotidů "downstream" sekvence (Schwer 2008). K prvním sestřihovým událostem tedy může docházet, až když je přepsáno minimálně 24 nukleotidů za 3' sestřihovým místem. Vzhledem k tomu, že první sestřihové události byly detekovány už po přepsání 26 - 27 nukleotidů, musí být RNA Pol II a spliceosom v té době velmi blízko u sebe (Carrillo Oesterreich et al. 2016b). Tato blízkost implikuje regulační propojení sestřihu a transkripce.

Pro toto propojení bylo navrženo několik vzájemně se nevylučujících a do určité míry komplementárních modelů. Prvním z nich je model kinetického spřažení ("kinetic coupling model"). Podle tohoto modelu je důležitým faktorem rychlost elongace transkripce, která určuje délku časového okna, po kterou sestřihové místo může využívat sestřihovou mašinerii, než bude toto sestřihové místo muset kompetovat s jiným, třeba silnějším sestřihovým místem, které však leží až za ním (Roberts et al. 1998; Kornblihtt 2007). To je důležité hlavně pro regulaci alternativního sestřihu u savců (zda bude sestřihové místo při kompetici se silnějším, ale "downstream" místem vůbec použito), ale u kvasinkového modelu ho lze aplikovat například pro výběr poly(A) místa a tedy pro regulaci délky posledního exonu. Možnost vazby regulačních (sestřihových) faktorů nemusí být ovlivněna jen prostou kompeticí míst, ale může zde hrát úlohu i vznik různých sekundárních struktur RNA při různě rychlé transkripci. Rychlejší transkripce dá vzniknout delšímu řetězci RNA, který se může složit způsobem, který zakrývá nebo naopak odkrývá vazebná místa jinak, než struktura vzniklá složením kratšího řetězce RNA vzniklého při pomalejší transkripci. Tento efekt byl pozorován například u kvasinkového genu *RPS23B*, který před kánonickým 3' sestřihovým místem obsahuje kryptické 3' sestřihové místo, které je za normální situace kryto sekundární strukturou (Meyer et al. 2011). Bylo zjištěno, že u mutant s rychlejší polymerázou je toto kryptické místo využíváno častěji. Autoři spekulují, že rychlejší transkripce oslabuje sekundární strukturu v této oblasti, takže je alternativní 3' sestřihové místo pro sestřih přístupnější (Aslanzadeh et al. 2018). Model kinetického spřažení je rovněž podpořen zjištěním, že při změně rychlosti polymerázy (například mutací) spliceosom svoji rychlost odpovídajícím způsobem nezmění. U rychlých mutant tak RNA Pol II přepsala delší část řetězce, než byly detekovány sestřihové události, a také s rychlou RNA Pol II asociovalo

více nesestřižené pre-mRNA, zatímco s pomalou RNA Pol II asociovalo více mRNA (Carrillo Oesterreich et al. 2016b; Aslanzadeh et al. 2018).

Druhý model propojení transkripce a sestřihu souvisí s vyvazováním sestřihových faktorů ("recruitment coupling model"). Tento model říká, že transkripční mašinerie napomáhá sestřihu tím, že do blízkosti vznikající pre-mRNA pomáhá vyvazovat sestřihové faktory. Důležitá úloha v tomto smyslu je připisována především C-terminální doméně (CTD) RNA Pol II (Misteli & Spector 1999). Tato doména se skládá z opakování heptapeptidu Tyr1-Ser2-Pro3-Thr4-Ser5-Pro6-Ser7. U kvasinek je tento peptid zopakován 26x, u savců 52x (Allison et al. 1985; Corden et al. 1985). Seriny, threonin a tyrosin mohou být fosforylovány a různá kombinace těchto fosforylací je spojena s různými fázemi elongace transkripce. U kvasinky *S. cerevisiae* je fosforylace na Ser5 a Ser7 typická pro iniciaci transkripce a časnou elongaci přes první exon, zatímco v pozdějších fázích elongace transkripce (přes druhý exon) a při terminaci transkripce dochází především k fosforylaci na Ser2, Thr4 a Tyr1 (shrnutí v (Herzel et al. 2017)). Analýza interaktomů CTD s různými typy fosforylací provedená v *S. cerevisiae* ukázala, že s výjimkou interaktomu fosforylovaného Thr4 jsou interaktomy všech ostatních fosforylací CTD nabohaceny o sestřihové faktory. Interaktom fosforylovaného Ser5 byl nabohacen o skoro 70 % proteinů asociovaných s U1 snRNP a na základě dalších pokusů bylo navrženo, že by fosforylace na Ser5 mohla hrát úlohu při vyvazování U1 snRNP (Harlen et al. 2016). U savčích buněk bylo ukázáno, že fosforylace na Ser2 je důležitá pro vyvazování U2AF65, savčího homologa proteinu Mud2 (David et al. 2011; Gu et al. 2012).

Na vyvazování sestřihových faktorů se však nemusí podílet jen CTD RNA Pol II. Podobnou úlohu mohou hrát také posttranslační modifikace histonů spojené s aktivní transkripcí. Rozložení histonů, jejich varianty a modifikace mohou rovněž ovlivňovat rychlost RNA Pol II a tedy ovlivňovat sestřih i podle prvního modelu. Propojení sestřihu s histonovými modifikacemi a variantami histonů bude blíže rozebráno v kapitole 2.3.

Zatím poslední model popisující různé aspekty propojení transkripce a sestřihu souvisí s 3D organizací chromatinu a membránou neohrazenými doménami vzniklými díky fázovému přechodu liquid-liquid ("liquid-liquid phase separation", LLPS), pro jehož vznik jsou mimo jiné zapotřebí proteiny s vnitřně neuspořádanou strukturou (viz další kapitola). Aby mohl kotranskripční sestřih efektivně probíhat, je nutné, aby byly všechny komponenty transkripce a sestřihu na jednom místě. V savčích buňkách bylo změřeno, že difúzní konstanta pro snRNP je v řádu 0,2 - 0,8 $\mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$ (Huranová et al. 2010), což je asi 100x pomaleji než ve vodě (Phair & Misteli 2000). Bylo navrženo, že transkripční a sestřihové faktory jsou v místě transkripce udržovány právě díky LLPS (Herzel et al. 2017), což je podporováno například zjištěním, že 18 polypeptidů v komplexu B obsahuje oblasti s vnitřně neuspořádanou strukturou (Neugebauer et al. 1995) nebo že CTD RNA Pol II je také schopna, díky své neuspořádané struktuře, podstoupit LLPS (Kwon et al. 2013).

Dalším důležitým aspektem regulace sestřihu a transkripce z hlediska struktury chromatinu je tvorba smyček na transkribovaných genech. Má se za to, že smyčka vytvořená mezi oblastí promotoru a terminátoru usnadňuje transkripci tím, že RNA Pol II může být efektivněji recyklována pro další kolo transkripce (Mapendano et al. 2010).

U kvasinek bylo ukázáno, že pro efektivní transkripci některých genů jsou důležité smyčky vytvořené mezi oblastí počátku transkripce a 5' sestřihovým místem a mezi terminátorem a 3' sestřihovým místem. Autoři studie předpokládají, že tyto smyčky napomáhají přiblížit oblast promotoru a terminátoru, což má za následek celkové usnadnění transkripce (Moabbi et al. 2012). Lákavá je i představa, že smyčky nenapomáhají jen recyklaci RNA Pol II, ale také sestřihových faktorů, které by tak byly rychleji k dispozici při započetí dalšího kola transkripce daného genu (Herzel et al. 2017).

2.2. Chromatin a transkripce

Chromatin je tvořen DNA, která je navinutá na nukleosomy. Nukleosomy se skládají z oktameru převážně kladně nabitých proteinů nazývaných histony. Každý nukleosom je tvořen jádrem tvořeným dvěma dvojicemi histonů H3 a H4 a k jádru přilehlými dvěma dvojicemi histonů H2A a H2B. Z funkčního hlediska jsou důležité N-konce histonů, které jsou tvořeny nestrukturovanými řetězci vyčnívajícími do prostoru. Tyto konce mohou být různě posttranslačně modifikovány, například methylovány, acetylovány, ubiquitinylovány, sumoylovány nebo ADP-ribosylovány. O významu některých modifikací bude pojednáno dále v textu.

Kromě kánonických histonů existují ještě různé další varianty, například varianta histonu H2A označovaná jako H2A.Z, které mají specifické funkce při různých buněčných procesech. Histonové variantě H2A.Z bude také věnována jedna z následujících kapitol.

2.2.1. Lokální struktura chromatinu jako klíčový faktor ovlivňující transkripci a související procesy

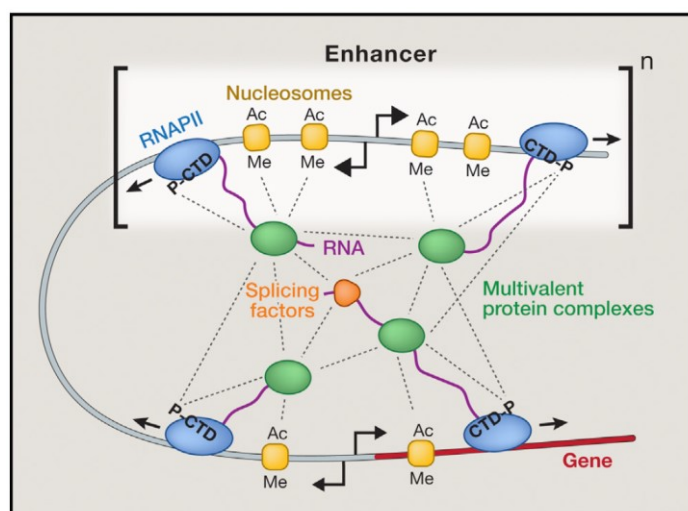
Na histonový oktamer je navinuto vlákno DNA. Na jeden nukleosom připadá asi 1,7 otočky DNA, což odpovídá asi 145 - 147 párům bazí. Mezi nukleosomy jsou volné úseky DNA o délce 20 - 80 párů bazí. Celá tato struktura, nazývaná také jako "korálky na niti", tvoří tzv. 10 nm vlákno a spolu s nehistonovými proteiny tvoří chromatin.

In vitro studie ukázaly, že se 10 nm vlákno skládá do vlákna o průměru 30 nm (Finch & Klug 1976). V průběhu let byly navrženy různé modely, jak by toto 30 nm vlákno mohlo vypadat. Mezi těmito modely byla i struktura solenoidu a zig-zag struktura známé z učebnic. Narůstá však počet studií, ve kterých autoři různými technikami ukazují, že 30 nm vlákno nejspíš *in vivo* neexistuje a vzniklo pravděpodobně jako artefakt *in vitro* studií prováděných při nízké koncentraci kationtů (Eltsov et al. 2008; Nishino et al. 2012; Fussner et al. 2011). Studie také ukazují, že chromatin se nejspíše skládá z nepravidelně složeného složitě propojeného 10 nm vlákna (Ricci et al. 2015). Tato struktura je navíc velmi dynamická, může se natahovat, smršťovat, ohýbat a tvořit smyčky (shrnutí v (Ozer et al. 2015)). Proto se na ni nahlíží jako na strukturu podobnou spíše kapalině než na pevnou strukturu. Pro tyto dynamické vlastnosti jsou důležité hlavně vnitřně neuspořádané N-konce histonů H3 a H4, které interagují s DNA, se sebou navzájem a s N-konci histonů H2A a H2B, a podle vzdálenosti, na jakou spolu interagují,

vzniká buď méně nebo více kondenzovaný chromatin (Zheng et al. 2005; Sinha & Shogren-Knaak 2010). Dynamika této struktury se může měnit v závislosti na posttranslačních modifikacích N-konců histonů nebo dalších proteinových faktorů regulujících přístupnost DNA (Collepardo-Guevara et al. 2015; Potoyan & Papoian 2012; Kalashnikova et al. 2013). Z výše uvedeného je patrné, že chromatin není v jádře homogenní. Techniky jako “Chromatin conformation capture” a další ukázaly na existenci domén v rámci chromatinu, které byly nazvány topologicky asociované domény (TAD, “topologically associating domains”) (Dekker et al. 2013; Dixon et al. 2012). V rámci těchto domén se zřejmě odehrávají procesy jako synchronizace replikace DNA nebo regulace transkripce pomocí enhancerů (Pope et al. 2014; Shen et al. 2012).

Jak už bylo naznačeno v kapitole o kotranskripčním sestřihu, vedle těchto topologicky asociovaných domén v buňce existují další určité membránou neohraničené mikrodomény. V jádře jsou to například jadérko, jaderné “speckles” a Cajalova tělíska v savcích buňkách, u kterých se má za to, že vznikly na základě LLPS. Pro vznik těchto mikrodomén a pro přechod mezi nimi jsou potřeba proteiny s vnitřně neuspořádanými oblastmi (“intrinsically disordered regions”) a RNA vazebnými doménami. Předpokládá se, že tyto domény asociují na základě elektrostatických interakcí mezi aminokyselinami v nestrukturovaných oblastech zúčastněných proteinů a mezi těmito oblastmi a RNA (shrnuje Courchaine et al. 2016)).

K čemu jsou mikrodomény dobré? V průběhu vývoje, ale i v situacích, kdy buňka musí rychle reagovat na náhlou změnu podmínek, je často potřeba regulovat expresi mnoha genů současně. Sdružení těchto genů do jedné mikrodomény společně s faktory, které jsou potřeba nejen pro transkripci daných genů, ale i pro jejich ko- a posttranskripční úpravy, výrazně zefektivní jejich expresi, protože se všechny potřebné faktory nacházejí na jednom místě (viz Obr. 3). Protože soudržnost mikrodomény nejspíše závisí především na kooperativní vazbě mezi nestrukturovanými oblastmi jednotlivých komponent, posttranslační modifikace a/nebo demodifikace těchto nestrukturovaných oblastí zapříčiní změnu jejich vazebných schopností (změnu jejich valence), což má za následek změnu ve struktuře mikrodomény (Hnisz et al. 2017). Některé proteiny mohou mikrodoménu opustit, jiným se změní aktivita, což vede ke změně výsledného procesu. Důležité je si také uvědomit důsledky takovéto regulace “na dálku”. Efekt posttranslační modifikace proteinu na jedné straně mikrodomény se přenesení do dalších částí mikrodomény a ovlivní funkci dalších proteinů, aniž by došlo k modifikaci těchto proteinů nebo jejich přímé interakci s daným modifikátorem, které by bylo možné experimentálně detekovat. K detailnímu pochopení procesů spojených s regulací genové exprese bude proto zapotřebí rozklíčovat tuto složitou síť vztahů, což je úkol pro vědu do dalších let.



Obr. 3 Příklad interakcí proteinů v mikrodoméně regulující transkripci. Převzato z (Hnisz et al. 2017).

2.2.2. Histonové modifikace

Jak už bylo zmíněno výše, N-konce histonů nesou různé posttranslační modifikace. Různé kombinace těchto posttranslačních modifikací souvisejí s různými stavy buněčného metabolismu, například s neaktivním heterochromatinem nebo naopak s aktivní transkripcí, a dohromady tvoří to, co se nazývá histonový kód. V buňce existují proteiny s doménami, které jsou schopny se na dané modifikace vázat a jejichž prostřednictvím buňka “čte” daný kód. Příkladem jsou bromodomény vázající se na acetylované zbytky nebo chromodomény rozpoznávající methylované zbytky. Vybrané chromatinové modifikace budou popsány v následujících částech.

2.2.2.1. Rad6 a ubiquitylace histonu H2B na lysinu 123

První modifikace, která bude podrobněji popsána, je ubiquitylace histonu H2B na lysinu 123 (H2BK123). Jde o modifikaci, která je spojována s aktivní transkripcí. Byla nalezena jak v promotorech, tak v kódující oblasti aktivně transkribovaných genů. Její výskyt kulminuje na nukleosomech +3 a +4 (Van Oss et al. 2016). Tato modifikace je zprostředkována ubiquitin-konjugacním enzymem (E2) Rad6, ubiquitin-ligázou (E3) Bre1 a jejich asociovaným proteinem Lge1 (Robzyk et al. 2000; Hwang et al. 2003; Wood, Krogan, et al. 2003).

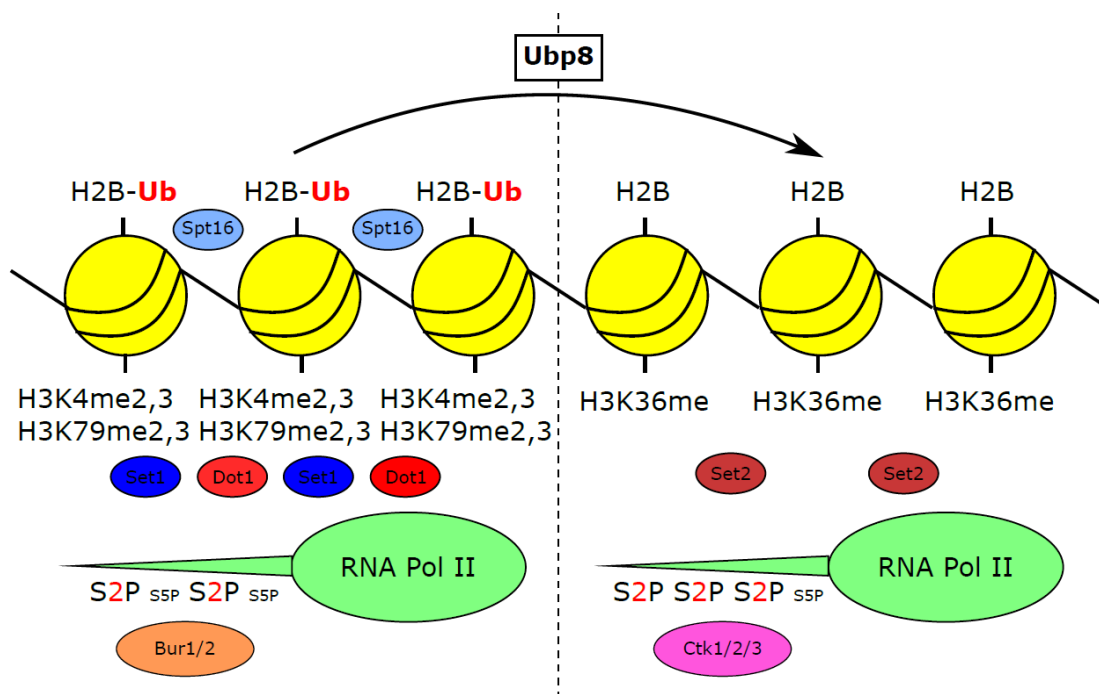
Souvislost ubiquitylace H2BK123 s aktivní transkripcí dokládá také fakt, že pro její úspěšný vznik komplexem Rad6/Bre1/Lge1 je potřeba několika komponent elongační mašinerie. Jednou z těchto komponent je cyklin-dependentní kináza Bur1 a její cyklin Bur2 (Murray et al. 2001). Tato kináza fosforyluje CTD RNA Pol II na Ser2 v časných fázích elongace transkripce (Liu et al. 2009; Qiu et al. 2009). Kromě toho ale fosforyluje také Rad6 na serinu 120, což se ukázalo jako modifikace nezbytná ke katalytické aktivaci Rad6 (Wood et al. 2005). Další komplex, který je *in vivo* potřeba pro vznik ubiquitylace

H2BK123, je elongační komplex PAF (Ng, Dole, et al. 2003; Wood, Schneider, et al. 2003; Xiao et al. 2005). Komplex PAF se skládá z pěti podjednotek (Paf1, Rtf1, Ctr9, Cdc73 a Leo1) a pro vznik ubiquitinylatione H2BK123 je důležitá především podjednotka Rtf1 a její doména HMD (“histone modification domain”) (Warner et al. 2007; Van Oss et al. 2016).

Ubiquitinylatione H2BK123 se regulačně podílí na mnoha buněčných procesech. Například ovlivňuje postup replikace (Trujillo & Osley 2012; Hung et al. 2017), opravy homologní rekombinací (Nakamura et al. 2011; Zeng et al. 2016), formování dvouřetězcových zlomů během meiózy (Yamashita et al. 2004; Xu et al. 2016) a ovlivňuje také délku a stabilitu telomer (Wu et al. 2017; Wu et al. 2018).

V souvislosti s transkripcí se ubiquitinylatione H2BK123 podílí na di- a trimethylaci histonu H3 na lysinu 4 (H3K4) a 79 (H3K79) v procesu nazvaném “mezihistonové interakce” (“trans-histone crosstalk”, viz dále) (Sun & Allis 2002; Briggs et al. 2002). Skrze tyto modifikace také reguluje umlčování genů a vznik heterochromatinu (Sun & Allis 2002; Wood, Krogan, et al. 2003). Spolu s chaperonem Spt16, který společně s proteinem Pob3 tvoří komplex FACT (“FACilitates Chromatin Transcription”) (Formosa et al. 2001), ubiquitinylovaný H2BK123 funkčně participuje také na přestavbách chromatinu. Autoři studie ukázali, že ubiquitinylatione H2BK123 je důležitá pro opětovnou depozici nukleosomů za elongující RNA Pol II. To je důležité pro zabránění iniciace transkripce z kryptických aktivačních sekvencí. Navíc byla pozorována pozitivní zpětná vazba mezi Spt16 a ubiquitinylatione H2BK123. Protein Spt16 usnadňoval vznik ubiquitinylatione H2BK123 a tato modifikace regulovala stabilitu akumulace Spt16 na testovaném genu *GALI* (Fleming et al. 2008).

Pro správný průběh elongace transkripce je ubiquitinylatione H2BK123 nutné také odstranit. Procesy spojené s cyklem ubiquitinylatione a deubiquitinylatione H2BK123 jsou znázorněny na obrázku 4. Odstranění je zprostředkováno deubiquitinylačním enzymem Upb8, který je součástí komplexů SAGA (“Spt-Ada-Gcn acetyltransferase”) a SALSA/SLIK (“SAGA-altered, Spt8 absent/ SGA-like”) (Daniel et al. 2004; Henry et al. 2003). V kmenech s delecí *UBP8* ubiquitinylatione H2BK123 přetrvávala, což znemožňovalo asociaci komplexu Ctk1/2/3 s chromatinem (Wyce et al. 2007). Tento komplex je důležitý pro fosforylaci CTD RNA Pol II na Ser2 v pozdějších fázích elongace transkripce (Qiu et al. 2009). Nepřítomnost fosforylace a přetrvávající ubiquitinylatione H2BK123 mění rozložení dalších chromatinových značek. Fosforylace na Ser2 je nutná pro vznik methylace histonu H3 na lysinu 36 (H3K36), což je modifikace spojovaná s pozdějšími fázemi elongace transkripce (Krogan, Kim, et al. 2003; Strahl et al. 2002). V buňkách s delecí *UBP8* byla hladina methylace H3K36 nižší než u divokých buněk (Henry et al. 2003). Hladina trimethylace H3K4, charakteristická pro 5' oblasti transkribovaných genů (Pokholok et al. 2005), u buněk s delecí *UBP8* naopak vzrostla (Henry et al. 2003). Deubiquitinylatione H2BK123 proteinem Upb8 tedy může sloužit jako kontrolní bod, který během elongace transkripce zajišťuje výměnu značek charakteristických pro časné fáze (trimethylace H3K4, na obrázku 4 vlevo) za značky související s pozdější fází (trimethylace H3K36, na obrázku 4 vpravo) (Wyce et al. 2007).



Obr. 4 Procesy spojené s cyklem ubiquitinylace a deubiquitinylace H2BK123. V časných fázích elongace transkripce (na obrázku vlevo) je přítomný ubiquitinylovaný H2BK123. Tato modifikace zprostředkuje di- a trimethylaci H3K4 a H3K79, což jsou modifikace charakteristické pro 5' konce transkribovaných genů. Ubiquitinylace H2BK123 také spolupracuje s histon chaperonem Spt16 na ovlivnění chromatinové struktury. V této době také začíná docházet k výměně fosforylace na Ser5 na RNA Pol II za fosforylaci na Ser2, v časných fázích elongace tento proces katalyzuje komplex Bur1/2. V pozdějších fázích elongace transkripce (na obrázku vpravo) dochází k deubiquitinylaci H2BK123 proteinem Ubp8. To umožňuje asociaci komplexu Ctk1/2/3, který katalyzuje účinnou fosforylaci RNA Pol II na Ser2. Tato modifikace se podílí na vyvazování histonmethyltransferázy Set2, která zprostředkuje methylaci na H3K36. Citace viz hlavní text.

Cyklus ubiquitinylace a deubiquitinylace byl také zahrnut do dalšího z modelů, jakým tato modifikace ovlivňuje přestavby chromatinu na transkribovaných genech. Podle tohoto modelu ubiquitinylace H2BK123 nukleosomy před RNA Pol II nejprve stabilizuje, čímž vytváří platformu pro snadnější vazbu Spt16 k chromatinu. Dále je ubiquitinylace H2BK123 proteinem Ubp8 odstraněna, což vede k destabilizaci nukleosomů a tím i usnadnění funkce proteinu Spt16. Destabilizované nukleosomy umožní snadnější průchod RNA Pol II. Po průchodu RNA Pol II Spt16 zase působí na nukleosomy stabilizačně, což je opět podporováno znovu ustavenou ubiquitinylací H2BK123 (Chandrasekharan et al. 2009).

2.2.2.2. *Set1 a mono-, di- a trimethylace histonu H3 na lysinu 4*

Další modifikace, která bude podrobněji popsána, je methylace H3K4. Methylace H3K4 může být realizována jako mono-, di- nebo trimethylace a všechny tyto stupně jsou zprostředkovány histonmethyltransferázou Set1, která je součástí komplexu nazývaného COMPASS (“COMplex of Proteins ASSociated with Set1”, komplex proteinů asociovaných se Set1) (Briggs et al. 2001; Roguev et al. 2001; Santos-Rosa et al. 2002).

Kromě Set1 COMPASS obsahuje dalších sedm proteinů, a to Bre2, Swd1, Swd2, Swd3, Spp1, Sdc1 a Shgl (Roguev et al. 2001).

Methylace H3K4 je také modifikace spojovaná s aktivní transkripcí a různě stupně methylace jsou charakteristické pro různé oblasti transkribovaných genů. Jakási “kánonická” představa je, že trimethylovaý H3K4 se vyskytuje v 5' oblastech transkribovaných genů (Santos-Rosa et al. 2002; Pokholok et al. 2005), dimethylovaný H3K4 je potom charakteristický pro střední části aktivních genů a monomethylovaný H3K4 pro 3' oblasti aktivně transkribovaných genů (Pokholok et al. 2005).

Pro vysvětlení vzniku tohoto vzorce byly navrženy dva modely. “Časový” model říká, že stupeň methylace závisí na tom, jak dlouho Set1 asociuje s danou oblastí genu. Tento model je podporován nálezem, že COMPASS preferenčně interaguje s CTD RNA Pol II fosforylovanou na Ser5 (Ng, Robert, et al. 2003), modifikací vzniklou v časných fázích elongace transkripce, a tedy charakteristickou pro oblasti blízko promotoru (Komarnitsky et al. 2000; Schroeder et al. 2000). V těchto oblastech je Set1 zadržován pomocí této modifikace účinněji než v dalších oblastech genů, kde tato modifikace není, a tím pádem vzniká dostatečně dlouhé časové okno pro trimethylaci H3K4. Druhým modelem je “poziční” model. Základ tohoto modelu tkví v pozorování, že delece různých podjednotek komplexu COMPASS různě ovlivní výsledný stupeň methylace (například (Schneider et al. 2005; Morillon et al. 2005; Dehé et al. 2006)). Bylo proto předpokládáno, že různé podjednotky komplexu COMPASS čtou různě chromatinový kontext podél genů, například další histonové modifikace, a podle toho potom ovlivňují funkci Set1 (Thornton et al. 2014).

Detailnější studie týkající se rozložení jednotlivých stupňů methylace podél genů však ukázala, že existuje poměrně velký počet genů, pro které výše zmíněný “kánonický” vzorec methylace neplatí. Rozložení vzorce methylace záviselo na síle exprese daného genu. Silně exprimované geny vykazovaly vysokou hladinu trimethylovaného H3K4 v 5' oblastech genů a distálněji následoval dimethylovaný H3K4. Naproti tomu slaběji exprimované geny často trimethylovaný H3K4 postrádaly a místo toho měly v promotoru dimethylovaný nebo dokonce jen monomethylovaný H3K4 (Soares et al. 2017). Závislost množství trimethylovaného H3K4 na síle exprese už byla pozorována i dříve (Pokholok et al. 2005). Tento výsledek naznačuje, že pro vznik “kánonického” rozložení methylovaných H3K4 je zapotřebí víc než jen jedno kolo transkripce a že vyšší stupně methylovaných H3K4 vznikají postupně. Pro vysvětlení vzniku “kánonického” rozložení methylovaných H3K4 autoři navrhli upravený “časový” model, tedy že úroveň methylovaného H3K4 je ovlivněna délkou interakce Set1 s cílovým nukleosomem v každém kole transkripce násobená počtem kol transkripcí za jednotku času (Soares et al. 2017). To, že je tento model pravděpodobný, dokládají i další jejich experimenty. Například u buněk s mutací zpomalující RNA Pol II je výskyt značek posunut proti směru transkripce (“upstream”), zatímco u buněk s mutací zrychlující RNA Pol II došlo k posunu značek v opačném směru, nebo například že fúze Set1 k RNA Pol II vedla k výskytu dimethylovaného H3K4 po celém genu a u vysoce exprimovaných genů byl stejný efekt pozorován i v případě trimethylovaného H3K4 (Soares et al. 2017).

Výsledky některých dalších studií naznačují, že pro vznik “kánonického” vzorce methylace H3K4 může být alespoň zčásti pravdivý i “poziční” model. Jak už bylo

zmíněno výše, pro vznik di- a trimethylace H3K4 je nutná také přítomnost ubiquitinylovaného H2BK123. Tomu ale úplně neodpovídají nálezy, že ubiquitinylovaný H2BK123 se nachází i dále v kódující oblasti genů než jen v blízkosti promotoru (Xiao et al. 2005; Bonnet et al. 2014). Nějakým způsobem ale ubiquitinylovaný H2BK123 na vzniku trimethylovaného H3K4 participovat musí, protože pro vznik trimethylovaného H3K4 histonmethyltransferázou Set1, která byla fúzována s RNA Pol II, byl potřeba ubiquitin-konjugační enzym Bre1 (Soares et al. 2017).

Mechanismů, jakým by ubiquitinylovaný H2BK123 mohl trimethylaci H3K4 zprostředkovat, bylo navrženo několik. Dvě studie přikládají důležitost komponentě komplexu COMPASS Swd2, i když každá práce navrhla jeho fungování jiným způsobem. Jedna práce říká, že schopnost trimethylace H3K4 komplexu COMPASS je zprostředkována interakcí mezi Swd2 a ubiquitinylovaným H2BK123 (Lee et al. 2007), zatímco podle druhé komplex Rad6/Bre1 katalyzuje kromě ubiquitinylace H2BK123 také ubiquitinylaci Swd2, což má za následek vyvázání Spp1 a teprve tato podjednotka dává komplexu COMPASS schopnost trimethylace (Vitaliano-Prunier et al. 2008). Další studie se opět týká Spp1 a autoři říkají, že trimethylační aktivita Set1 je stimulována interakcí mezi její doménou N-SET, Spp1 a ubiquitinylovaným H2BK123 (Kim et al. 2013). Protein Spp1 se dostává do centra pozornosti i ve třetí studii. Podle modelu, který autoři navrhli, se komplex COMPASS váže přes Spp1 k chromatinu přes Arg119 a Thr122 histonu H2B. Pouze v případě, že je H2BK123 ubiquitinylován, ale dochází k takovému uspořádání komplexu COMPASS a stabilizaci jeho podjednotek, že je schopen trimethylační aktivity (Chandrasekharan et al. 2010). Kromě participace ubiquitinylovaného H2BK123 na vzniku vícenásobné methylace H3K4 ovlivněním komplexu COMPASS může tato modifikace hrát roli i ve stabilizaci methylovaných H3K4 tím, že zabraňuje vyvazování demethylázy H3K4 Jhd2 (Liang et al. 2007; Tu et al. 2007; Huang et al. 2015). Tato demethyláza se váže na Phe26 a Glu57 histonu H2A a má se za to, že ubiquitin na H2BK123 tato místa vazby blokuje (Huang et al. 2015).

Co se týká fyziologické role methylovaného H3K4, je poměrně široká. Na trimethylovaný H3K4 se svou doménou PHD váže protein Yng1 (Taverna et al. 2006), což je komponenta histonacetyltransferázového komplexu NuA3 (Howe et al. 2002). PHD doménu obsahuje také protein Yng2, což je podjednotka histonacetyltransferázového komplexu NuA4 (Loewith et al. 2000). Skrze tyto interakce dochází k acetylaci H3 respektive k usnadnění acetylace H4 v 5' oblastech transkribovaných genů, což vede k rozvolnění chromatinové struktury a tím k usnadnění pohybu RNA Pol II (Protacio et al. 2000) a/nebo k podpoře vazby dalších faktorů stimulujících transkripci změnami ve struktuře chromatinu (Carey et al. 2006).

Prostřednictvím dimethylovaného H3K4 se přes podjednotku Set3 váže k transkribovaným genům komplex Set3C. Set3C je histondeacetyláza, ale ukázalo se, že i deacetylace ovlivňuje transkripci pozitivním způsobem (Kim & Buratowski 2009). Pro vysvětlení byly navrženy vzájemně se nevylučující hypotézy. První z nich je, že deacetylace napomáhá zabránění transkripce z kryptických aktivačních sekvencí, které se mohou v otevřených čtecích rámcích genů vyskytovat. Druhou hypotézou potom je, že Set3C zabraňuje rozšiřování acetylace a tím remodelaci chromatinu z promotorů do dalších oblastí genů. Dimethylace H3K4 by tak mohla sloužit jako jakási značka, která

odděluje oblast vysoce přístupného chromatinu v promotorech od méně přístupného v oblastech dále od promotoru (Buratowski & Kim 2010).

Navzdory tomu, že di- a trimethylace H3K4 je považována za značku spojovanou s aktivní transkripcí, ztráta obou těchto modifikací delecí určitých podjednotek komplexu COMPASS vedla ke zvýšené expresi asi 1 % všech kvasinkových genů. Bylo pozorováno, že u divokých buněk mají tyto geny reverzní rozmístění mono-, di- a trimethylovaného H3K4 oproti kánonické situaci, tedy hladina trimethylovaného H3K4 byla nejvyšší na 3' koncích genů, dimethylovaný H3K4 byl v tělech genů a 5' konec genů byl nabohacen o monomethylovaný H3K4. Tento efekt je pravděpodobně způsoben probíhající protisměrnou ("antisense") transkripcí daných genů a je to zřejmě tato "antisense" transkripce, skrze kterou COMPASS reprimuje expresi "sense" genů. Byl navržen dvojí mechanismus, jak represe může probíhat (Margaritis et al. 2012). U jedné skupiny genů hraje roli přítomnost samotného "antisense" transkriptu. Tento efekt byl popsán už dříve pro regulaci exprese genu *PHO84*, u kterého je "antisense" transkript schopen regulovat transkripci jak *in cis*, tak *in trans*, a to zřejmě skrze vyvazování histondeacetylázových komplexů (Camblong et al. 2007; Camblong et al. 2009). Pro represu druhé skupiny genů je zřejmě důležitý samotný proces "antisense" transkripce. Delece oblasti obsahující potenciální promotor "antisense" transkriptu také vedla k derepresi "sense" transkriptu, zatímco delece exosomální komponenty *RRP6*, což je podmínka dostatečná pro umlčení genu *PHO84* skrze stabilizaci "antisense" transkriptu, už pro tyto geny dostačující nebyla (Margaritis et al. 2012).

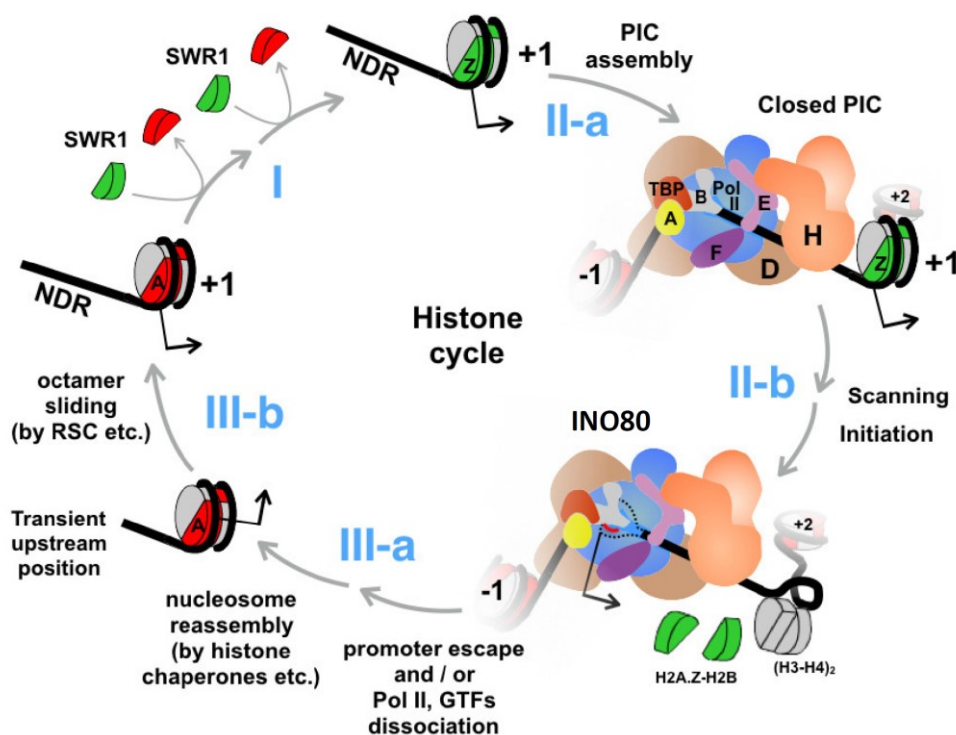
Methylace H3K4 se dále podílí i na regulaci umlčování genů v oblastech telomer (Nislow et al. 1997; Singer et al. 1998) a oblastech kódujících rDNA (Briggs et al. 2001; Bryk et al. 2002) a ukázalo se, že participuje i na regulaci apoptózy (Walter et al. 2014) a koordinaci průběhu buněčného cyklu (Beilharz et al. 2017).

2.2.3. Histonová varianta H2A.Z

Varianta histonu H2A, H2A.Z, je jednou z nejstudovanějších histonových variant. Jako jediná histonová varianta je konzervována u většiny eukaryotických organismů. Kánonickému histonu H2A je podobná jen asi ze 60 %, což naznačuje, že má ve srovnání s histonem H2A unikátní úlohu (Thatcher & Gorovsky 1994). U kvasinky *S. cerevisiae* je H2A.Z kódován genem *HTZ1*, který není na rozdíl od homologních genů z ostatních testovaných eukaryotických organismů esenciální (Jackson & Gorovsky 2000). Poznatky týkající se této varianty popsané v následujících odstavcích se týkají právě kvasinkového Htz1. Histonová varianta H2A.Z je typická pro nukleosomy -1 a +1 kolem počátků transkripce. Ačkoliv asi jen 5 % nukleosomů obsahuje tuto variantu, je přítomna asi v 65 % promotorů (Guillemette et al. 2005; Raisner et al. 2005). Histon H2A.Z byl nicméně detekován i v otevřených čtecích rámcích různých genů (Albert et al. 2007; Jin & Felsenfeld 2007).

Fyziologická role histonu H2A.Z je spojena s transkripcí (viz dále), umlčováním genů (Meneghini et al. 2003; Zhang et al. 2004) a například s opravami DNA (Xu et al. 2012). V tomto přehledu se budu věnovat hlavně jeho roli při transkripci. Model procesů

souvisejících s histonem H2A.Z během transkripčního cyklu je zobrazen na obrázku 5 (Tramantano et al. 2016).



Obr. 5 Nukleosomový cyklus v promotorech transkribovaných genů. Převzato z (Tramantano et al. 2016), upraveno.

Histon H2A.Z je inkorporován do nukleosomu +1 (a -1) (krok I). Poté dochází k sestavení preiniciačního komplexu (PIC, “Preinitiation complex”) (krok II-a) a ke skenování (krok II-b). Nukleosom +1 je následně odstraněn a dochází k vlastnímu zahájení transkripce. Když RNA Pol II opustí promotor, dojde k opětovnému navázání dimeru H2A/H2B na nukleosom +1, ale v této situaci se tento nukleosom nejspíš nachází v pozici posunuté vůči té původní, dále od místa počátku transkripce (krok III-a). Nukleosom se poté do výchozí pozice +1 dostane pomocí remodelačních faktorů (krok III-b) a celý histonový cyklus může začít znovu (Tramantano et al. 2016).

Narozdíl od kánonických histonů, které jsou do chromatinu inkorporovány během replikace DNA, jsou histonové varianty, včetně této, vnášeny během celého buněčného cyklu. Htz1 je do nukleosomů inkorporován jako dimer H2A.Z/H2B výměnou za dimer H2A/H2B (krok I na obrázku 5). Dva dimery H2A/H2B jsou v nukleosomu nahrazovány postupně. Nejprve je nahrazen jeden dimer, čímž vzniká tzv. heterotypický nukleosom, a poté je vyměněn druhý dimer, čímž vzniká homotypický nukleosom (Luk et al. 2010).

Za inkorporaci je odpovědný komplex SWR1. Tento komplex se skládá z katalytické podjednotky Swr1 obsahující ATPázovou/helikázovou doménu, která je také přítomna v podjednotkách chromatin-remodelačních komplexů z rodiny Swi2/Snf2, a z dalších 13 proteinů. Některé z těchto podjednotek jsou součástí i jiných komplexů, například histonacetyltransferázového komplexu NuA4 a komplexu INO80 (viz dále)

(Krogan, Keogh, et al. 2003; Kobor et al. 2004; Mizuguchi et al. 2004). Kromě katalytické podjednotky Swr1, která je také hlavní platformou pro sestavení celého komplexu (Wu et al. 2005; Wu et al. 2009), jsou dále důležité podjednotky Swc2, Arp4 a Bdf1. Podjednotka Swc2 zprostředkovává přímou vazbu H2A.Z a jeho transfer do chromatinu (Wu et al. 2005). Má také klíčovou úlohu při cílení komplexu k nukleosomu +1. Usuzuje se, že ten rozpoznává díky přítomnosti alespoň 50 - 70 bp dlouhé oblasti bez nukleosomů (NFR, “nucleosome free region”) (Yen et al. 2013; Ranjan et al. 2013). Arp4 se významnou měrou podílí na udržování strukturální integrity celého komplexu (Wu et al. 2009). Protein Bdf1 obsahuje dvě bromodomény, skrze které je schopen se vázat na acetylované histony (Ladurner et al. 2003; Matangkasombut & Buratowski 2003). Acetylace histonů je totiž další prvek, který napomáhá depozici histonu H2A.Z, a to nejen acetylace zprostředkovaná histonacetyltransferázou NuA4, která sdílí některé komponenty s komplexem SWR1 (Raisner et al. 2005; Altaf et al. 2010; Auger et al. 2008; Krogan, Keogh, et al. 2003; Mizuguchi et al. 2004; Kobor et al. 2004), ale i acetylace zprostředkovaná komplexy SAGA, NuA3 a histonacetyltransferázou Elp3 (Raisner et al. 2005; Zhang et al. 2005). Na základě těchto poznatků byl představen model, podle kterého je cílení komplexu SWR1 k promotorům závislé na hierarchické kooperaci mezi DNA a histonovými značkami. Komplex SWR1 je primárně vyvazován na základě rozpoznání NFR. Poté je díky interakcím Bdf1 s různými acetylovanými lysiny vyladěno směřování k nukleosomům +1 a -1 a možná je tím i zajištěna direkcionálnost reakce (Ranjan et al. 2013). Acetylace různých histonových zbytků totiž může hrát různou roli. Bylo zjištěno, že acetylace histonu H3 na lysinu 56 (H3K56ac) mění substrátovou specifitu reakce komplexu SWR1. V přítomnosti této značky komplex SWR1 histony H2A.Z z nukleosomů odstraňuje; pro depozici H2A.Z je tedy nutná nepřítomnost H3K56ac. Na základě dalších výsledků Watanabe a kol. také navrhli, že protein Swc2 může sloužit jako jakýsi zámek, který brání zpětnému odstranění H2A.Z z nukleosomu komplexem SWR1 (Watanabe et al. 2013).

U kvasinky *S. cerevisiae* nukleosom +1 překrývá počátek transkripce. Má se proto za to, že během aktivace transkripce musí být tento nukleosom z chromatinu odstraněn (krok II-b na obrázku 5). S tímto předpokladem koresponduje pozorování, že po aktivaci genů byla hladina nukleosomů +1 obsahujících histon H2A.Z snížena. Vzhledem k tomu, že *in vitro* experimenty ukázaly, že nukleosomy obsahující variantu H2A.Z jsou méně stabilně asociovány s DNA než nukleosomy obsahující kánonickou variantu H2A a jsou tedy náchylnější k uvolnění z chromatinu, se předpokládá, že histony H2A.Z připravují geny k rychlejší iniciaci transkripce (Santisteban et al. 2000; Guillemette et al. 2005; Li et al. 2005; Zhang et al. 2005).

Role při odstraňování histonu H2A.Z byla přisouzena komplexu INO80 (Papamichos-Chronakis et al. 2006; Yen et al. 2013; Papamichos-Chronakis et al. 2011) (krok II-b na obrázku 5). Výsledky některých studií však naznačují, že na odstraňování histonů H2A.Z z promotorů tento komplex neparticipuje (Jeronimo et al. 2015; Tramantano et al. 2016). Ukázalo se však, že pro odstranění nukleosomu na pozici +1 je důležitý PIC. Z dat také vyplynulo, že odstranění nukleosomů obsahujících H2A.Z je spojeno s transkripcí a není to nezávislý proces probíhající před formováním PIC. Co přesně během iniciace transkripce způsobí odstranění nukleosomu obsahujícího H2A.Z,

zatím tedy není jasné, ale autoři spekulují, že by se tak mohlo dít v důsledku skenování promotoru faktorem TFIIF (Tramantano et al. 2016).

Co se týká elongace transkripce, byla ukázána genetická interakce mezi *htz1Δ* a alelami genů kódujícími různé elongační faktory, například *DST1*, *RPB9*, *SET2*, *SPT4*, *SPT5*, *SPT16* a mezi faktory, které jsou součástí komplexu PAF (Collins et al. 2007; Santisteban et al. 2011; Biswas et al. 2005; Krogan et al. 2004; Krogan, Keogh, et al. 2003; Krogan, Kim, et al. 2003; Malagon et al. 2004; Venkatasubrahmanyam et al. 2007; Wilmes et al. 2008). Histon H2A.Z je možná důležitý pro asociaci RNA Pol II s otevřenými čtecími rámci transkribovaných genů, výsledky dvou studií na toto téma si ale odporují (Santisteban et al. 2011; Neves et al. 2017). Výše zmíněné studie také ukazují, že histon H2A.Z ovlivňuje fosforylaci CTD RNA Pol II na Ser2, i když obě skupiny došly k rozdílným výsledkům. V jedné studii autoři ukazují, že v buňkách s delecí genu *HTZ1* je hladina RNA Pol II s fosforylovaným Ser2 nižší než u divokých buněk (Santisteban et al. 2011), zatímco v druhé studii je ukázáno, že delece genu *HTZ1* způsobuje zvýšení hladiny RNA Pol II s fosforylovaným Ser2 (Neves et al. 2017). Tyto diskrepance lze vysvětlit použitím různých protilátek a modelových genů, každopádně pro ověření výsledků bude třeba provést další experimenty. Histon H2A.Z se také ukázal být důležitý pro správnou asociaci elongačních faktorů k RNA Pol II. V nepřítomnosti histonu H2A.Z byla také rychlost RNA Pol II o 24 % nižší než u divokých buněk a byla snížena schopnost remodelace nukleosomů během transkripce (Santisteban et al. 2011). Na základě těchto výsledků byly navrženy dva modely, jakými by mohl histon H2A.Z participovat na pozitivní regulaci elongace transkripce. Za prvé by mohl napomáhat správnému sestavení elongačního komplexu a za druhé by mohl být důležitý pro usnadnění remodelace nukleosomů nejen v promotorech genů, ale i v otevřených čtecích rámcích, a tím pozitivně ovlivňovat průchod RNA Pol II (Santisteban et al. 2011).

2.3. Chromatin a kotranskripční sestřih

Jak bylo zmíněno v kapitole 2.1.2., histonové modifikace a varianty histonů se také podílejí na regulaci sestřihu, zřejmě ovlivněním vyvazování sestřihových faktorů. Poznatky o zapojení vybraných modifikací do regulace sestřihu získaných na kvasince *S. cerevisiae* budou popsány v následujících kapitolách.

2.3.1. Sestřih a ubiquitylace H2BK123

Na existenci propojení mezi ubiquitylací H2BK123 a sestřihem pre-mRNA poukázaly genetické interakce mezi deleční alelou genu *BRE1* a mutovanými alelami faktorů, které jsou součástí U1 snRNP (*MUD2*, *NAM8*), U2 snRNP (*SPP382*, *MSL1*, *MUD2* a *LEA1*) a U4/U6-U5 tri-snRNP (*PRP4* a *SNU66*). Byla také ukázána syntetická lethality mezi neubiquitylovatelnou formou histonu H2B *htb1-K123R* a delecemi genů kódujících komponenty U2 snRNP *Msl1* a *Lea1* (Shieh et al. 2011; Moehle et al. 2012).

Silná negativní genetická interakce až syntetická lethality byla také pozorována mezi delečními alelami *BRE1* a *RAD6* a deleční alelou *NPL3* (Moehle et al. 2012). *Npl3*

je jeden ze tří kvasinkových proteinů typu SR (Gilbert et al. 2001; Häcker & Krebber 2004), který se jako jediný z nich účastní sestřihu pre-mRNA (Kress et al. 2008). Bylo také zjištěno, že proteiny Npl3 a Bre1 spolu fyzicky interagují (Moehle et al. 2012). Buňky s delecí genu *NPL3* vykazovaly sestřihový defekt, který se projevil akumulací pre-mRNA, a to převážně pre-mRNA genů pro ribosomální proteiny (Kress et al. 2008). Tento defekt zhoršovala delece genu *BRE1* (Moehle et al. 2012). V souvislosti s preferenčním ovlivněním sestřihu genů pro ribosomální proteiny není bez zajímavosti nálezn, že tyto geny vykazují oproti ostatním intron-obsahujícím genům zvýšenou hladinu ubiquitinylovaného H2BK123, a to jak v exonech, tak i v intronech (Shieh et al. 2011).

Bylo také ukázáno, že už samotná delece genu *BRE1* zvyšuje hladinu pre-mRNA některých genů, a to hlavně při kultivaci buněk ve zvýšené teplotě 39 °C (Moehle et al. 2012; Hérissant et al. 2014). Ve snaze odhalit mechanismus, jakým ubiquitylace H2BK123 ovlivňuje sestřih, byly pomocí chromatinové imunoprecipitace zjišťovány změny v asociaci sestřihových faktorů s intron-obsahujícími geny. Výsledky získané chromatinovou imunoprecipitací prováděné při normální kultivační teplotě 30 °C neodhalily sníženou asociaci testovaných komponent spliceosomu s intronickými geny u buněk *bre1Δ* nebo u buněk *bre1Δ npl3Δ* ve srovnání s divokými buňkami (Moehle et al. 2012), avšak analýza proteinů, které asociují s mRNP imunoprecipitovanými za značku TAP na proteinu vázajícím čepičku (Cbc2), odhalila při 39 °C snížené množství komponent U1 a U2 snRNP u kmene s mutací *htb1-K123R* (Hérissant et al. 2014). Tento výsledek by naznačoval, že při oslabení fungování kotranskripční maturace mRNA (vlivem 39 °C a mutace *htb1-K123R*) se projeví defekt ve vyvazování U1 a U2 snRNP, tedy defekt ve vyvazování těch snRNP, které mají zajistit včasný sestřih. Toto však lze detekovat jen na některých genech, které jsou k danému defektu citlivé.

2.3.2. Sestřih a acetylace histonů

Další histonovou modifikací, u které je dokumentován vliv na sestřih, je acetylace. Gcn5 je histonacetyltransferáza (Candau et al. 1997), která acetyluje histony H2B a H3 (Suka et al. 2001) převážně v promotorových oblastech, ale může acetylovat i v kódujících oblastech genů (Govind et al. 2007; Ginsburg et al. 2009). Byly pozorovány negativní genetické interakce mezi delečními alelami sestřihových faktorů (konkrétně komponent U2 snRNP Msl1 a Lea1) a deleční alelou *GCN5* (Gunderson & Johnson 2009) nebo alelami histonů, které znemožňují acetylaci zprostředkovanou Gcn5. Rovněž delece genů pro histondeacetylázy Hos2 a Hos3, jejichž aktivita směřuje na stejné histonové zbytky jako aktivita Gcn5 (Carmen et al. 1999; Wang et al. 2002), a současná delece genů *MSL1* nebo *LEA1* vedla ke znemožnění růstu při snížené kultivační teplotě (Gunderson et al. 2011). Výsledky získané pomocí chromatinové imunoprecipitace ukázaly, že v buňkách *gcn5Δ* docházelo ke zpožděnému vyvazování U2 snRNP na testovaných sestřihovaných genech a toto zpoždění se pak přenášelo do pozdějších fází sestavování spliceosomu, kdy kotranskripční asociace U5 snRNP nebyla téměř detekovatelná (Gunderson & Johnson 2009). Delece genů pro histondeacetylázy *HOS2* a *HOS3* vedla naopak k hyperakumulaci komponent U2 snRNP a nebyl pozorován jejich

typický pokles na 3' koncích testovaných genů. Vyvazování komponent U5 snRNP a komplexu NTC bylo rovněž postiženo. Tyto výsledky naznačují, že správně probíhající cyklus acetylace a deacetylace histonů je důležitý pro regulaci sestavování spliceosomu, kdy je vyžadováno správné časování asociace a následné disociace jednotlivých sestřihových komponent (Gunderson et al. 2011). Snížení hladiny acetylovaných histonů u buněk *gcn5Δ* však autoři detekovali pouze v promotorových oblastech testovaných genů (Gunderson & Johnson 2009). Otázkou tedy zůstává, jak se tento signál přenáší do kódujících oblastí, kdy je potřeba regulovat sestavování spliceosomu.

2.3.3. Sestřih a histonová varianta H2A.Z

Vzhledem k tomu, že histonová varianta H2A.Z ovlivňuje jak iniciaci, tak elongaci transkripce (viz výše), není překvapivé, že byly nalezeny souvislosti i mezi touto histonovou variantou a regulací sestřihu pre-mRNA. Celogenomová studie z roku 2012 odhalila, že delece různých podjednotek komplexu SWR1 vede k akumulaci pre-mRNA, přičemž nejsilnější efekt v tomto smyslu vykazoval kmen s delecí genu *BDF1*. Chromatinová imunoprecipitace také odhalila, že delece genu *BDF1* vedla ke snížení množství U1 snRNP na vybraných genech (Albulescu et al. 2012).

Studiem vlivu samotného histonu H2A.Z na sestřih pre-mRNA u kvasinky *S. cerevisiae* se zabývala skupina Tracy L. Johnson. V rámci jejich studie byly odhaleny negativní genetické interakce mezi deleční alelou genu *HTZ1* a delečními alelami komponent U1 snRNP (*MUD1*), komplexu “commitment” (*MUD2*), U2 snRNA (*MSL1*, *LEA1* a *SNU17*), U4/U6-U5 tri-snRNP (*SNU66*) a komplexu NTC (*CWC21* a *ISY1*). Výsledky získané sekvenováním RNA (RNA-seq) dále ukázaly, že delece genu *HTZ1* vede k mírné akumulaci pre-mRNA neribosomálních intron-obsahujících genů a efekt je horší, pokud gen obsahuje nekonsenzuální sekvenci kolem místa větvení (Neves et al. 2017). Histon H2A.Z je sice typický hlavně pro nukleosom +1 (viz výše), ale reanalýza dat získaných metodou chromatinové imunoprecipitace spojené se sekvenováním izolované DNA (ChIP-seq) ze starší publikace (Gu et al. 2015) ukázala, že nukleosomy obsahující histon H2A.Z se u intron-obsahujících neribosomálních genů nacházejí také těsně před místem větvení a 3' sestřihovým místem, takže zapojení histonu H2A.Z do regulace sestřihu je z hlediska fyzické lokalizace H2A.Z u těchto genů možné (Neves et al. 2017). Autoři dále pomocí chromatinové imunoprecipitace detekovali změny ve vyvazování sestřihových faktorů na vybrané neribosomální intronické geny u buněk s delecí genu *HTZ1*. Zatímco vzorec vyvazování Prp42, který reprezentuje U1 snRNP, zůstal stejný jako u divokých buněk, u U2 snRNP reprezentovaného faktorem Msl1 docházelo k vyšší akumulaci na lokusu blízko 3' konce testovaných genů (Neves et al. 2017). V souladu s modelem postupného vyvazování snRNP k sestřihovaným genům (Görnemann et al. 2005) pak docházelo ke zpožděné asociaci U5 snRNP (konkrétně proteinu Snu114) na jeden lokus u každého ze sledovaných genů. Autoři také pozorovali snížené množství RNA Pol II na testovaných lokusech, což by naznačovalo problémy s elongací transkripce. Mutace ovlivňující elongaci transkripce vedla ke zhoršení sestřihového fenotypu buněk *htz1Δ*, včetně prohloubení akumulace U2 snRNP.

Na základě výše zmíněných poznatků autoři navrhli model, ve kterém histon H2A.Z ovlivňuje elongaci transkripce, skrze kterou potom dochází ke změnám ve vyvazování sestřihových faktorů, což má za následek problémy při sestřihu pre-mRNA, a to zvláště u genů s nekánonickými sestřihovými místy. V souladu s tímto modelem je i jejich nález, že mutace snižující expresi ATPázy Prp43 suprimuje sestřihový defekt způsobený mutacemi v genu pro H2A.Z (Neves et al. 2017). Prp43 katalyzuje rozpad spliceosomu po proběhnutí reakce a účastní se i rozpadu spliceosomu, pokud se průběh sestřihové reakce zpomalí vlivem nekánonické sestřihové sekvence (Arenas & Abelson 1997; Koodathingal et al. 2010; Koodathingal & Staley 2013).

K podobným závěrům došla i skupina Ch. Guthrie ve své práci provedené na kvasince *Schizosaccharomyces pombe* (Nissen et al. 2017). Autoři rovněž zjistili negativní genetické interakce mezi podjednotkami komplexu SWR1 a sestřihovými faktory a odhalili zvýšené množství pre-mRNA u buněk s mutacemi v genech kódujících histon H2A.Z nebo v genech kódujících podjednotky komplexu SWR1. Bylo také pozorováno, že sestřih u těchto mutantů je zhoršen hlavně u genů s nekánonickými sestřihovými místy a že histon H2A.Z je nabohacen na hranicích exon-intron právě u takových genů. Autoři navrhli model, podle kterého by histon H2A.Z mohl sloužit jako značka intronů se slabými sestřihovými místy, což by nějakým způsobem mohlo napomáhat jejich sestřihu. Mutace slabých sestřihových míst na konsenzuální totiž opravdu vedla k supresi sestřihového fenotypu u mutantů v genech pro komplex SWR1 a histon H2A.Z a rovněž nadprodukce ATPázy Prp16, která katalyzuje přechod mezi prvním a druhým krokem sestřihové reakce (Horowitz 2011), potlačovala sestřihový fenotyp v daných mutantách (Nissen et al. 2017).

2.4. Proteiny SNW

Proteiny SNW byly v určitých typech esejů identifikovány jako koaktivátory a korepresory transkripčních faktorů a adaptory pojmenované podle motivu SNWKN (Folk et al. 1996). Tyto proteiny jsou dobře konzervované napříč eukaryotickou říší. Zatím jedinými organismy, u kterých nebyl protein SNW identifikován, jsou jednobuněčná červená řasa *Cyanidioschyzon merolae* a mikrosporidie *Encephalitozoon cuniculi* (Stark et al. 2015; Katinka et al. 2001). Tyto organismy mají extrémně redukovaný spliceosom a u *C. merolae* například nebyly nalezeny ani komponenty U1 snRNP (Stark et al. 2015). Nejvíce studovaní zástupci jsou lidský SKIP, dále Snw1 ze *Schizosaccharomyces pombe*, BX42 z *Drosophila melanogaster*, atSKIP z *Arabidopsis thaliana* a Prp45 z *S. cerevisiae*.

2.4.1. Lidský ortholog SKIP

Lidským orthologem proteinů SNW je SKIP. Jméno je odvozeno od Ski-interakční protein, protože onkoprotein Ski byl identifikován jako první z jeho vazebných partnerů (Dahl et al. 1998). SKIP se účastní vzniku mRNA na úrovni iniciace i elongace transkripce, interaguje s faktory ovlivňujícími histonové modifikace a podílí

se také na regulaci sestřihu pre-mRNA. Pro fungování v takto široké škále procesů je významná skutečnost, že obsahuje vnitřně neuspořádané oblasti (“intrinsically disordered regions” (Wang et al. 2010)), které mu umožňují strukturně se přizpůsobit svým interakčním partnerům.

Co se týká iniciace transkripce, SKIP interaguje s transkripčními faktory jako VDR/RXR (Baudino et al. 1998; Zhang et al. 2001), Smad2/3 (Leong et al. 2001), MyoD (Kim et al. 2001), pRB (Prathapam et al. 2002) a E2F (Giangrande et al. 2003). Kromě toho také v rámci dráhy Delta/Notch interaguje s transkripčním faktorem CBF1 a podílí se na přestavbě represorového komplexu na aktivátorový (Zhou et al. 2000).

Nedávné studie ukázaly zapojení proteinu SKIP do elongace transkripce. Poté, co RNA Pol II opustí promotor a přepíše 20 - 40 nukleotidů, dochází k jejímu pozastavení (“RNA Polymerase II proximal pausing”), za které jsou odpovědné faktory DSIF (“DRB-sensitivity inducing factor”) a NELF (“Negative elongation factor”). Pro uvolnění RNA Pol II z tohoto bloku je důležitý pozitivní transkripční elongační faktor b (P-TEFb). Ten fosforyluje NELF, čímž je tento represor uvolněn, dále fosforyluje DSIF, čímž ho přeměňuje z elongačního represoru na aktivátor, a také fosforyluje CTD RNA Pol II na Ser2. Všechny tyto fosforylace vedou k zahájení elongace transkripce (shrnutí v (Koch et al. 2008)).

P-TEFb využívá pro svoji transkripci také virus HIV. Všechny virové transkripty začínají smyčkou TAR, která je tvořena z nukleotidů přepsaných před zastavením RNA Pol II. Tuto smyčku váže protein Tat, který interaguje s P-TEFb. Přes interakci Tat:TAR je P-TEFb přinášen k virovým transkriptům, kde uvolní RNA Pol II z pauzy a dojde k zahájení elongace transkripce (shrnutí v (Garber & Jones 1999)). Bylo ukázáno, že SKIP je *in vitro* i *in vivo* vyžadován pro stimulaci elongace virových transkriptů, ale ne pro jejich iniciaci. Tato stimulace se zřejmě děje skrze fyzickou interakci proteinu SKIP s P-TEFb a s komplexem P-TEFb:Tat:TAR (Brès et al. 2005).

Při analýze přesnější funkce proteinu SKIP při expresi transkriptů viru HIV bylo zjištěno, že SKIP není vyžadován pro vyvazování Tat, P-TEFb, RNA Pol II ani pro modulaci hladiny její fosforylace na Ser2 nebo Ser5. SKIP tedy musí fungovat až po těchto proteinech. Ukázalo se, že SKIP je potřeba k vyvázání faktorů c-Myc a TRRAP (“Transformation-transactivation domain-associated protein”) (Brès et al. 2009), který skrze vyvazování histonacetyltransferáz zprostředkuje acetylaci promotorů (Murr et al. 2007). SKIP byl také vyžadován pro trimethylaci H3K4 ve virovém promotoru. Bylo zjištěno, že SKIP a c-Myc přímo interagují s proteinem Menin (Brès et al. 2009), což je podjednotka MLL1, tedy jednoho z lidských histonmethyltransferázových komplexů zprostředkujících (tri)methylaci H3K4 (shrnutí v (Shilatifard 2008)). Zajímavé však je, že samotná trimethylace H3K4 ani další podjednotky histonmethyltransferázového komplexu MLL1 k transaktivaci (tj. k expresi stimulované interakci Tat:TAR) potřeba nebyly. Menin tak možná ovlivňuje elongaci virových transkriptů nezávisle na MLL1 a trimethylace H3K4 stimulovaná proteinem SKIP může mít jinou úlohu (Brès et al. 2009). V savčích buňkách bylo ukázáno, že trimethylace H3K4 je rozpoznávána proteinem CHD1, který dále vyvazuje U2 snRNP (Sims et al. 2007). Protein SKIP by tedy mohl skrze stimulaci trimethylace H3K4 regulovat vyvazování spliceosomu k transkribovaným genům (Brès et al. 2009). Trimethylace H3K4 je spojena

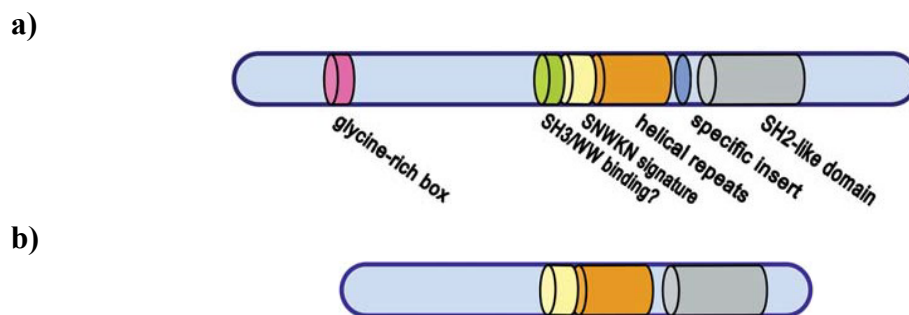
s ubiquitylací histonu H2B (viz kapitola 2.2.2.2.). Ubiquitylace H2B nebyla pro transaktivaci virových transkriptů vyžadována. Pro jejich bazální expresi (tzn. nezávislou na Tat:TAR) však ano, stejně jako protein SKIP. Bylo ukázáno, že při bazální expresi je protein SKIP vyvazován k virovým promotorům právě prostřednictvím ubiquitylace H2B. Ba co víc, SKIP interagoval přes tuto značku i s “celkovým” chromatinem, ne pouze specificky s genem HIV-1. Je proto možné, že při transaktivaci přebírá roli ubiquitylace H2B ve vyvazování proteinu SKIP protein Tat (Brès et al. 2009).

Role proteinu SKIP při sestřihu pre-mRNA byla definována krátce po jeho objevení v roce 1998, kdy byl SKIP rozpoznán jako součást spliceosomu (Neubauer et al. 1998). Další studie identifikovala protein SKIP jako součást komplexu CDC5L, který vstupuje do sestřihové reakce těsně před aktivací spliceosomu, je přítomný po čas obou transesterifikačních reakcí a odstupuje s vyštěpeným intronem (Makarov et al. 2002). SKIP v rámci spliceosomu fyzicky interaguje s některými podjednotkami U5 snRNP (Zhang et al. 2003) a prostřednictvím svého dlouhého α -helixu váže helikázu Prp22 (Bertram et al. 2017), která se jednak účastní druhého kroku sestřihu (Schwer & Gross 1998) a jednak participuje na uvolnění sestřižené mRNA ze spliceosomu (Company et al. 1991). V rámci spliceosomu SKIP interaguje také s proteinem PPIL1 (“Peptidyl-prolyl isomerase-like 1”), který je proteinem SKIP vyvazován do spliceosomu a který zřejmě slouží jako foldáza nebo chaperon usnadňující přestavby spliceosomu během katalytických reakcí (Xu et al. 2006).

Jak je patrné z předchozích odstavců, protein SKIP se účastní mnoha drah regulujících transkripci a úpravy primárního transkriptu, v rámci kterých fyzicky interaguje s různými partnery. Jak už bylo řečeno na začátku kapitoly, tato široká škála interakcí je umožněna rozsáhlou vnitřně neuspořádanou oblastí v molekule proteinu SKIP, která mu umožňuje strukturně se přizpůsobit svým interakčním partnerům (Wang et al. 2010). Obecná funkce proteinu SKIP může spočívat ve vyvazování faktorů, které katalyzují nebo minimálně usnadňují přestavby komplexů v rámci procesů spojených s genovou expresí, tak jak je to ve spliceosomu zprostředkováno chaperonem/foldázou PPIL1. Obdobné komponenty při procesech iniciace a elongace transkripce však teprve čekají na své objevení.

2.4.2. Kvasinkový ortholog Prp45

Orthologem proteinů SNW v kvasince *S. cerevisiae* je protein Prp45. Od orthologů z ostatních organismů se strukturně odlišuje (viz obr. 6). Velikost lidského proteinu SKIP je 536 aminokyselin a 61,5 kDa, zatímco Prp45 má pouze 379 aminokyselin a 42 kDa. Oproti proteinu SKIP Prp45 postrádá kus N-koncové části včetně oblasti bohaté na glycin. Ostatní motivy, jako doména obsahující konzervovaný motiv SNWKN, helikální oblast a doména podobná SH2 (“SH2-like”), jsou zachovány, i když jejich podobnost s doménami v ostatních proteinech SNW je snížena (Folk et al. 2004).



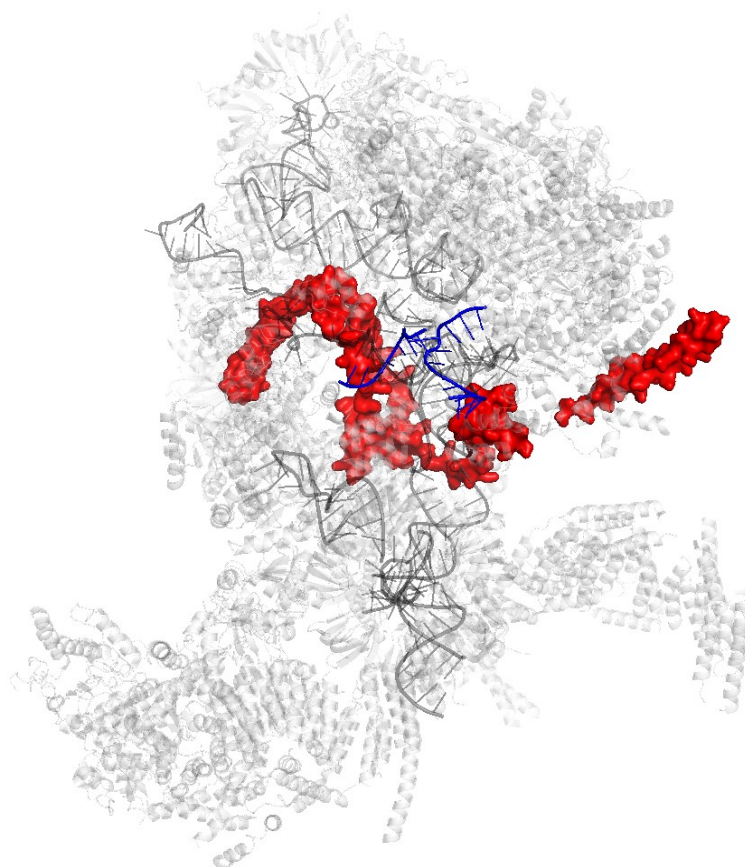
Obr. 6 Domény a motivy proteinů SNW. (a) kánonická struktura proteinů SNW, např. lidského proteinu SKIP, **(b)** struktura proteinu Prp45. Převzato a upraveno z (Folk et al. 2004).

Prp45 je, stejně jako orthologové z ostatních organismů, esenciální protein. Prvotní pokus o nalezení termosensitivních bodových mutací nebyl úspěšný (Harris et al. 1992). V naší laboratoři byla vytvořena paleta N- i C-terminálních zkrácených variant proteinu Prp45 exprimovaných z plazmidů a byla testována jejich schopnost komplementovat růst kvasinek s deletovaným genem *PRP45* (Martinkova et al. 2002; Gahura et al. 2009). Výsledky ukázaly, že pro komplementaci je důležitá přítomnost N-terminální oblasti proteinu Prp45. Buňky exprimující pouze prvních 168 aminokyselin (varianta *prp45*(1-168)) byly schopné komplementovat růst při 30 °C, ovšem při 37 °C vykazovaly termosenzitivní fenotyp. Za zmínku také stojí, že buňky s delecí absolutně konzervovaného motivu SNWKN byly schopny komplementovat růst buněk *prp45Δ*, a to jak při běžné kultivační teplotě 30 °C, tak i při zvýšené teplotě 37 °C. Pro další studium funkce proteinu Prp45 byly připraveny buňky nesoucí chromosomální mutaci *prp45*(1-169) exprimující prvních 169 aminokyselin proteinu Prp45 a další charakterizace funkce tohoto proteinu byly v naší laboratoři prováděny pomocí této termosenzitivní alely (Gahura et al. 2009).

Funkce proteinu Prp45 byla zatím v literatuře spojena pouze se sestřihem pre-mRNA. Poprvé byl Prp45 identifikován jako součást komplexu penta-snRNP, který byl izolován z kvasinkových sestřihových extraktů pomocí značky na jednom z integrálních proteinů partikule U4/U6-U5 snRNP za podmínek s nízkým obsahem soli. Kromě Prp45 tento komplex obsahoval všechny spliceosomální U snRNA a také téměř všechny proteiny jednotlivých partikulí snRNP (Stevens et al. 2002). V další studii bylo ukázáno, že Prp45 koprecipitoval s pre-mRNA, s lariát-exonem 2, s exonem 1 a s vystřiženým intronem, což naznačilo, že Prp45 je ve spliceosomu přítomen během obou transesterifikačních reakcí a odstupuje s vystřiženým intronem (Albers et al. 2003). Toto zjištění bylo později podpořeno identifikací proteinu Prp45 jako součásti komplexů B, B^{ACT} i C v *in vitro* konstituovaných spliceosomech (Fabrizio et al. 2009). Přímý vliv Prp45 na sestřih byl prokázán na základě akumulace nesestřiženého reportérového substrátu při depleci Prp45 (Albers et al. 2003). Výsledky naší laboratoře ukázaly, že mutace v *PRP45* zhoršuje sestřih reportérových substrátů založených na konstruktu *ACT1-CUP1* s nekánonickými rekombinantními sestřihovými místy (Gahura et al. 2009).

Co se týká interakčních partnerů Prp45, pomocí dvojhybridního systému byla ukázána fyzická interakce mezi Prp45 a proteiny Prp46, Prp22 a Syf3 (Albers et al. 2003;

Gahura et al. 2009). S využitím alely *prp45*(1-169) byly v naší laboratoři identifikovány genetičtí interakční partneři, mezi které patří alely faktorů druhého sestřihového kroku *SLU7*, *PRP17*, *PRP18* a *PRP22* a alely podjednotek komplexu NTC *SYF1*, *SYF3*, *NTC20* a *CEF1* (Gahura et al. 2009). Na základě těchto poznatků byla funkce proteinu Prp45 spojena převážně s druhým krokem sestřihu. Průlom v identifikaci dalších fyzických interakčních partnerů proteinu Prp45 umožnil rozmach kryoelektronové mikroskopie, díky kterému můžeme podrobněji nahlédnout na uspořádání proteinů a RNA lidských i kvasinkových (z *S. cerevisiae* i *S. pombe*) spliceosomů ve stádiích komplexů B, B^{ACT}, C, C* a ILS (Yan et al. 2015; Yan et al. 2016; Yan et al. 2017; Galej et al. 2016; Rauhut et al. 2016; Ruixue Wan et al. 2016; Bertram et al. 2017; Fica et al. 2017). Části Prp45/Snw1/SKIP byly v těchto pracích také identifikovány. Ukázalo se, že tento protein má neobvyklou extendovanou strukturu a prochází napříč celým spliceosomem (viz obr. 7). Toto uspořádání je v souladu s predikovanými rozsáhlými vnitřně neuspořádanými oblastmi proteinu Prp45/Snw1/SKIP (Korneta & Bujnicki 2012; Wang et al. 2010).

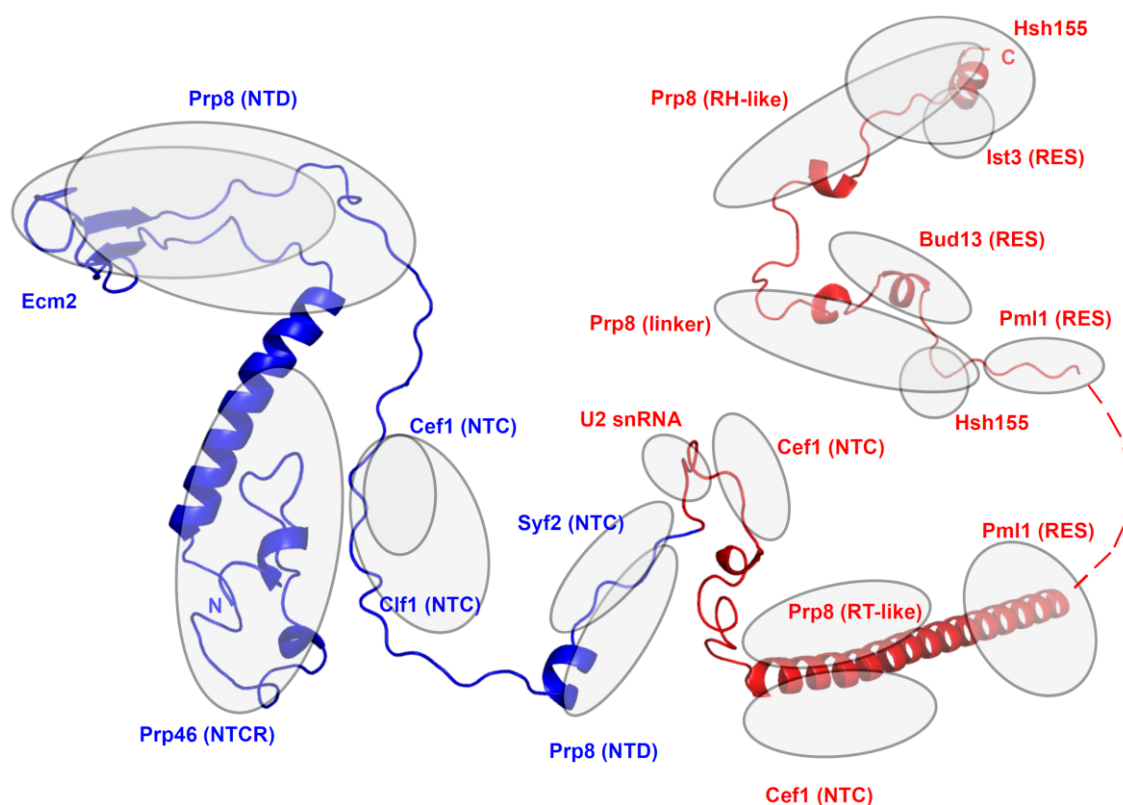


Obr. 7 Extendovaná struktura Prp45/Snw1. Červeně je zobrazen Snw1, ortholog Prp45 z kvasinky *S. pombe*. Modře je zobrazena pre-mRNA, šedě ostatní komponenty spliceosomu. Obrázek byl vytvořen na základě dat z (Yan et al. 2015).

Ze struktur také vyplynulo, že motiv SNWKN se nachází v blízkosti katalytického centra spliceosomu, kde interaguje s U2 a U6 snRNP (Yan et al. 2015). Strukturní studie

potvrdily dosud nalezené fyzické interakční partnery proteinu Prp45/Snw1/SKIP a byli nalezeni i další, nejen kolem katalytického centra (Obr. 8). Mezi nejvýznamnější interaktory patří podjednotky komplexu RES (“Retention and splicing complex”) Pml1, Ist3 a Bud13, které jsou důležité pro sestřih a zadržení nesestřižených pre-mRNA v jádře (Ohi et al. 2002) a které Prp45 zřejmě stabilizuje na pozici mezi proteiny Hsh155 a určitou oblastí proteinu Prp8 (Yan et al. 2016). Prp45 dále několika oblastmi interaguje s proteinem Prp8, což je největší a nejkonzervovanější spliceosomální protein, který je součástí U5 snRNP a o kterém se ví, že tvoří jakýsi strukturní základ celého spliceosomu. Mezi interakční partnery patří rovněž komponenty komplexu NTC, jako Cef1, Clf1 a Syf2. Oblasti, kterými Prp45 interaguje s výše vyjmenovanými proteiny, jsou znázorněny na obrázku 8. Tento obrázek vznikl kombinací strukturní informace získané z komplexu B^{ACT} z *S. cerevisiae* a C* z člověka (Yan et al. 2016; Bertram et al. 2017). Vzhledem k tomu, že Prp45 interaguje s mnoha spliceosomálními proteiny včetně těch složek, které přímo tvoří katalytické centrum, se předpokládá, že Prp45 toto centrum stabilizuje.

Díky jeho extendované struktuře a přítomnosti mnoha vnitřně neuspořádaných oblastí byla vytvořena teorie, že Prp45 umožňuje přenos konformačních změn odehrávajících se v katalytickém centru do oblastí spliceosomu vzdálenějších od centra. Prp45 tak může usnadňovat dynamické procesy odehrávající se během sestřihu pre-mRNA (Yan et al. 2015; Galej et al. 2016; R. Wan et al. 2016).



Obr. 8 Prp45 a jeho interakční partneři. Modře a červeně je znázorněn Prp45 (modrá část znázorňuje aminokyseliny 1-169, červeně je zbytek proteinu). Čárkovaně je zobrazena oblast, jejíž strukturní informace chybí. Šedé ovály znázorňují interakční partnery Prp45. Obrázek vznikl

zkombinováním struktur Prp45 *S. cerevisiae* ve spliceosomálním komplexu B^{ACT} a SKIP z člověka ve splicosomálním komplexu C* (Yan et al. 2016; Bertram et al. 2017). Převzato z (Hálová et al. 2017).

Jak už bylo řečeno výše, role Prp45 byla zatím v literatuře identifikována jen v rámci sestřihu pre-mRNA. Na základě poznatků o ortholozích proteinu Prp45 z jiných organismů se však lze domnívat, že by se mohl regulačně podílet i na transkripci. Tento předpoklad je podporován pozorováním, že navedení Prp45 do promotoru reportérového genu vedlo k aktivaci jeho transkripce (Martinkova et al. 2002). Výsledky získané v rámci mé disertační práce odhalují bližší podrobnosti o zapojení Prp45 do regulace sestřihu pre-mRNA a rovněž přispívají k hlubšímu pochopení toho, jak Prp45 participuje na regulaci transkripce.

3. Cíle práce

Cílem mého doktorského projektu bylo blíže charakterizovat vztah proteinu Prp45 kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* k procesům souvisejícím se sestřihem pre-mRNA a iniciací a elongací transkripce.

Pro práci byly vytyčeny a postupně upřesňovány dílčí cíle:

Role Prp45 v sestřihu pre-mRNA:

- 1) Analyzovat transkriptomická data divokého kmene a kmene *prp45(1-169)* z hlediska sestřihu pre-mRNA.
- 2) Analyzovat vztah akumulace pre-mRNA u buněk *prp45(1-169)* k funkcím RNA-specifických degradačních drah.
- 3) Zjistit metodou chromatinové imunoprecipitace vliv mutace *prp45(1-169)* na kotranskripční sestavování spliceosomu.

Vliv Prp45 na transkripci:

- 4) Analyzovat vliv mutace *prp45(1-169)* na indukci genů neobsahujících intron.
- 5) Zjistit, zda delece genů souvisejících s elongací transkripce a modifikacemi chromatinu samostatně nebo v kombinaci s mutací *prp45(1-169)* vykazují defekt v sestřihu pre-mRNA.
- 6) Studovat genetické interaktory alely *prp45(1-169)* metodou “Synthetic genetic array” (SGA).
- 7) Vytvořit další mutace v *PRP45* (pro následné testování fenotypu buněk v kombinaci s delecí genu *HTZ1*) a charakterizovat jejich fenotyp.
- 8) Analyzovat sestřih u kmenů nesoucích jednu z nově vytvořených mutací v *PRP45* v kombinaci s delecí genu *HTZ1*.

4. Materiál a metody

4.1. Materiál

4.1.1. Použité kmeny

Kvasinkové kmeny

| Název | Genotyp | Zdroj |
|------------------|---|-------------------------|
| BY4741 | MATa <i>his3ΔI leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i> | Euroscarf |
| BY4742 | MATalfa <i>his3ΔI leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0</i> | Euroscarf |
| AVY17 | MATa <i>his3ΔI leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 prp45(1–169)-3HA::NatMX6</i> | tato práce |
| AVY18 | MATalfa <i>his3ΔI leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 prp45(1–169)-3HA::NatMX6</i> | tato práce |
| <i>upf1Δ</i> | MATalfa <i>his3ΔI leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 upf1::KanMX4</i> | Euroscarf |
| AVY70 | MATalfa <i>his3ΔI leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 upf1::KanMX4 prp45(1–169)-3HA::NatMX6</i> | tato práce |
| <i>upf3Δ</i> | MATalfa <i>his3ΔI leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 upf3::KanMX4</i> | Euroscarf |
| AVY71 | MATalfa <i>his3ΔI leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 upf3::KanMX4 prp45(1–169)-3HA::NatMX6</i> | tato práce |
| <i>ski7Δ</i> | MATalfa <i>his3ΔI leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 ski7::KanMX4</i> | Euroscarf |
| AVY90 | MATalfa <i>his3ΔI leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 ski7::KanMX4 prp45(1–169)-3HA::NatMX6</i> | tato práce |
| <i>xrn1Δ</i> | MATalfa <i>his3ΔI leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 xrn1::KanMX4</i> | Euroscarf |
| AVY91 | MATalfa <i>his3ΔI leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 xrn1::KanMX4 prp45(1–169)-3HA::NatMX6</i> | tato práce |
| <i>prp42</i> -HA | MATa <i>ura3 his3-11 leu2-3,112 trp1-1 can1-100 prp42::prp42HA/KanMX6 rpo21::rpo21MYC/HIS</i> | (Kotovic et al. 2003) |
| KAY21 | MATa <i>ura3 his3-11 leu2-3,112 trp1-1 can1-100 prp42::prp42HA/KanMX6 rpo21::rpo21MYC/HIS prp45(1–169)-NatMX6</i> | (Hálová et al. 2017) |
| <i>msl5</i> -HA | MATa <i>ura3 his3-11 leu2-3,112 trp1-1 can1-100 MSL5-HA/TRP</i> | (Görnemann et al. 2005) |
| KAY22 | MATa <i>ura3 his3-11 leu2-3,112 trp1-1 can1-100 MSL5-HA/TRP</i> | (Hálová et al. |

| | | |
|------------------|--|-------------------------|
| | <i>prp45(1-169)::NatMX6</i> | 2017) |
| <i>mud2</i> -HA | MATa <i>ura3 his3-11 leu2-3,112 trp1-1 can1-100 MUD2</i> -HA/TRP | (Görnemann et al. 2005) |
| KAY23 | MATa <i>ura3 his3-11 leu2-3,112 trp1-1 can1-100 MUD2</i> -HA/TRP <i>prp45(1-169)::NatMX6</i> | (Hálová et al. 2017) |
| <i>msl1</i> -HA | MATa <i>ura3 his3-11 leu2-3,112 trp1-1 can1-100 MSL1</i> -HA/TRP | (Görnemann et al. 2005) |
| KAY24 | MATa <i>ura3 his3-11 leu2-3,112 trp1-1 can1-100 MSL1</i> -HA/TRP <i>prp45(1-169)::NatMX6</i> | (Hálová et al. 2017) |
| <i>brr2</i> -HA | MATa <i>ura3 his3-11 leu2-3,112 trp1-1 can1-100 BRR2</i> -HA/TRP <i>DBP2</i> -GFP/Kanr (JG12) | (Görnemann et al. 2005) |
| MHY15 | MATa <i>ura3 his3-11 leu2-3,112 trp1-1 can1-100 BRR2</i> -HA/TRP <i>DBP2</i> -GFP/Kanr (JG12) <i>prp45(1-169)</i> | (Hálová et al. 2017) |
| <i>prp19</i> -HA | MATa <i>ura3 his3-11 leu2-3,112 trp1-1 can1-100 PRP19</i> -HA <i>DBP2</i> -GFP (JG12) | (Görnemann et al. 2005) |
| MHY16 | MATa <i>ura3 his3-11 leu2-3,112 trp1-1 can1-100 PRP19</i> -HA <i>DBP2</i> -GFP (JG12) <i>prp45(1-169)</i> | (Hálová et al. 2017) |
| <i>bur2</i> Δ | MATa <i>his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 bur2::KanMX4</i> | Euroscarf |
| AVY56-D | MATa <i>prp45(1-169)-3HA::NatMX6 bur2::kanMX4 his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 met15Δ0</i> | tato práce |
| AVY57-D | MATalfa <i>prp45(1-169)-3HA::NatMX6 bur2::kanMX4 his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 lys2Δ0 met15Δ0</i> | tato práce |
| <i>paf1</i> Δ | MATalfa <i>his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 paf1::KanMX4</i> | Euroscarf |
| AVY34-3C | MAT? <i>prp45(1-169)-3HA::NatMX6 paf1::kanMX4 his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 lys? met?</i> | tato práce |
| AVY35-5C | MAT? <i>prp45(1-169)-3HA::NatMX6 paf1::kanMX4 his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 lys? met?</i> | tato práce |
| AVY36-6D | MATa <i>prp45(1-169)-3HA::NatMX6 paf1::kanMX4 his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 met15Δ0</i> | tato práce |
| <i>rad6</i> Δ | MATalfa <i>his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 rad6::KanMX4</i> | Euroscarf |
| AVY38-6C | MAT? <i>prp45(1-169)-3HA::NatMX6 rad6::kanMX4 his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 lys? met?</i> | tato práce |
| AVY37-5C | MAT? <i>prp45(1-169)-3HA::NatMX6 rad6::kanMX4 his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 lys? met?</i> | tato práce |
| AVY39-9D | MATa <i>prp45(1-169)-3HA::NatMX6 rad6::kanMX4 his3Δ1</i> | tato práce |

| | | |
|---------------|--|------------------|
| | <i>leu2Δ0 ura3Δ0</i> | |
| <i>ubp8Δ</i> | MATa <i>his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 ubp8::KanMX4</i> | Euroscarf |
| AVY80 | MATa <i>prp45(1-169)-3HA::NatMX6 his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 ubp8::kanMX4</i> | tato práce |
| AVY92 | MATa <i>his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 set1::KanMX6</i> | tato práce |
| AVY93 | MATa <i>his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 set1::KanMX6 prp45(1-169)-3HA::NatMX6</i> | tato práce |
| <i>gcn5Δ</i> | MATa <i>his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 gcn5::KanMX4</i> | Euroscarf |
| AVY69 | MATa <i>prp45(1-169)-3HA::NatMX6 his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 gcn5::kanMX4</i> | tato práce |
| <i>rtf1Δ</i> | MATa <i>his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 rtf1::KanMX4</i> | Euroscarf |
| AVY51 | MATa <i>prp45(1-169)-3HA::NatMX6 his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 rtf1::kanMX4</i> | tato práce |
| <i>brelΔ</i> | MATalfa <i>his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 brel::KanMX4</i> | Euroscarf |
| AVY54-B | MATalfa <i>prp45(1-169)-3HA::NatMX6 brel::kanMX4 his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0</i> | tato práce |
| AVY55-C | MATa <i>prp45(1-169)-3HA::NatMX6; brel::kanMX4 his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 met15Δ0</i> | tato práce |
| <i>lge1Δ</i> | MATa <i>his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 lge1::KanMX4</i> | Euroscarf |
| AVY88 | MATa <i>prp45(1-169)-3HA::NatMX6 his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 lge1::kanMX4</i> | tato práce |
| <i>sgf11Δ</i> | MATa <i>his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 sgf11::KanMX4</i> | Euroscarf |
| AVY81 | MATa <i>prp45(1-169)-3HA::NatMX6 his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 sgf11::kanMX4</i> | tato práce |
| Y8835 | MATalfa <i>ura3::NatMX6 can1Δ::STE2pr-Sp_his5 lyp1Δ his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0</i> | laboratoř B. Liu |
| KAY27 | MATalfa <i>can1Δ::STE2pr-Sp_his5 lyp1Δ ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 met15Δ0 prp45(1-169)-3HA::NatMX6</i> | tato práce |
| <i>htz1Δ</i> | MATa <i>his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 htz1::KanMX4</i> | Euroscarf |
| <i>swr1Δ</i> | MATa <i>his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 swr1::KanMX4</i> | Euroscarf |
| <i>vps71Δ</i> | MATa <i>his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 vps71::KanMX4</i> | Euroscarf |
| <i>vps72Δ</i> | MATa <i>his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 vps72::KanMX4</i> | Euroscarf |
| <i>swc3Δ</i> | MATa <i>his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 swc3::KanMX4</i> | Euroscarf |

| | | |
|-----------------|--|------------|
| <i>swc5Δ</i> | MATa <i>his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 swc5::KanMX4</i> | Euroscarf |
| <i>Htz1-1A</i> | MAT? <i>his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 met15Δ0? htz1::kanMX +pRS416-ADH-PRP45?</i> | tato práce |
| <i>Htz1-1B</i> | MAT? <i>his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 lys2Δ0 met15Δ0? prp45(1-169)::NatMX6 htz1::kanMX +pRS416-ADH-PRP45?</i> | tato práce |
| <i>Htz1-1C</i> | MAT? <i>his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 met15Δ0? +pRS416-ADH-PRP45?</i> | tato práce |
| <i>Htz1-1D</i> | MAT? <i>his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 lys2Δ0 met15Δ0? prp45(1-169)::NatMX6 +pRS416-ADH-PRP45?</i> | tato práce |
| <i>Htz1-2A</i> | MAT? <i>his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 +pRS416-ADH-PRP45?</i> | tato práce |
| <i>Htz1-2B</i> | MAT? <i>his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 met15Δ0 htz1::kanMX +pRS416-ADH-PRP45?</i> | tato práce |
| <i>Htz1-2C</i> | MAT? <i>his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 lys2Δ0 met15Δ0 prp45(1-169)::NatMX6 +pRS416-ADH-PRP45?</i> | tato práce |
| <i>Htz1-2D</i> | MAT? <i>his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 lys2Δ0 prp45(1-169)::NatMX6 htz1::kanMX +pRS416-ADH-PRP45?</i> | tato práce |
| <i>Htz1-3A</i> | MAT? <i>his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 lys2Δ0 +pRS416-ADH-PRP45?</i> | tato práce |
| <i>Htz1-3B</i> | MAT? <i>his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 met15Δ0 prp45(1-169)::NatMX6 htz1::kanMX +pRS416-ADH-PRP45?</i> | tato práce |
| <i>Htz1-3C</i> | MAT? <i>his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 met15Δ0 prp45(1-169)::NatMX6 htz1::kanMX +pRS416-ADH-PRP45?</i> | tato práce |
| <i>Htz1-3D</i> | MAT? <i>his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 lys2Δ0 +pRS416-ADH-PRP45?</i> | tato práce |
| <i>Htz1-11A</i> | MAT? <i>his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 met15Δ0 +pRS416-ADH-PRP45?</i> | tato práce |
| <i>Htz1-11B</i> | MAT? <i>his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 htz1::kanMX +pRS416-ADH-PRP45?</i> | tato práce |
| <i>Htz1-11C</i> | MAT? <i>his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 lys2Δ0 met15Δ0 prp45(1-169)::NatMX6 +pRS416-ADH-PRP45?</i> | tato práce |
| <i>Htz1-11D</i> | MAT? <i>his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 lys2Δ0 prp45(1-169)::NatMX6 htz1::kanMX +pRS416-ADH-PRP45?</i> | tato práce |
| <i>Swr1-11A</i> | MAT? <i>his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 met15Δ0? swr1::kanMX +pRS416-ADH-PRP45?</i> | tato práce |
| <i>Swr1-11B</i> | MAT? <i>his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 lys2Δ0 met15Δ0? prp45(1-169)::NatMX6 swr1::kanMX +pRS416-ADH-PRP45?</i> | tato práce |

| | | |
|-----------------|---|------------|
| <i>Swr1-11C</i> | MAT? <i>his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 lys2Δ0 met15Δ0? prp45(1-169)::NatMX6 +pRS416-ADH-PRP45?</i> | tato práce |
| <i>Swr1-11D</i> | MAT? <i>his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 met15Δ0? +pRS416-ADH-PRP45?</i> | tato práce |
| <i>Swr1-12A</i> | MAT? <i>his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 swr1::kanMX +pRS416-ADH-PRP45?</i> | tato práce |
| <i>Swr1-12B</i> | MAT? <i>his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 met15Δ0 swr1::kanMX +pRS416-ADH-PRP45?</i> | tato práce |
| <i>Swr1-12C</i> | MAT? <i>his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 lys2Δ0 met15Δ0 prp45(1-169)::NatMX6 +pRS416-ADH-PRP45?</i> | tato práce |
| <i>Swr1-12D</i> | MAT? <i>his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 lys2Δ0 prp45(1-169)::NatMX6 +pRS416-ADH-PRP45?</i> | tato práce |
| <i>Swr1-13A</i> | MAT? <i>his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 prp45(1-169)::NatMX6 +pRS416-ADH-PRP45?</i> | tato práce |
| <i>Swr1-13B</i> | MAT? <i>his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 +pRS416-ADH-PRP45?</i> | tato práce |
| <i>Swr1-13C</i> | MAT? <i>his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 lys2Δ0 met15Δ0 prp45(1-169)::NatMX6 swr1::kanMX +pRS416-ADH-PRP45?</i> | tato práce |
| <i>Swr1-13D</i> | MAT? <i>his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 lys2Δ0 met15Δ0 swr1::kanMX +pRS416-ADH-PRP45?</i> | tato práce |
| <i>Swr1-14A</i> | MAT? <i>his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 prp45(1-169)::NatMX6 +pRS416-ADH-PRP45?</i> | tato práce |
| <i>Swr1-14B</i> | MAT? <i>his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 lys2Δ0 met15Δ0 swr1::kanMX +pRS416-ADH-PRP45?</i> | tato práce |
| <i>Swr1-14C</i> | MAT? <i>his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 +pRS416-ADH-PRP45?</i> | tato práce |
| <i>Swr1-14D</i> | MAT? <i>his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 lys2Δ0 met15Δ0 prp45(1-169)::NatMX6 swr1::kanMX +pRS416-ADH-PRP45?</i> | tato práce |
| <i>Vps71-1A</i> | MAT? <i>his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 prp45(1-169)::NatMX6 vps71::kanMX +pRS416-ADH-PRP45?</i> | tato práce |
| <i>Vps71-1B</i> | MAT? <i>his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 lys2Δ0 met15Δ0 prp45(1-169)::NatMX6 +pRS416-ADH-PRP45?</i> | tato práce |
| <i>Vps71-1C</i> | MAT? <i>his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 lys2Δ0 vps71::kanMX +pRS416-ADH-PRP45?</i> | tato práce |
| <i>Vps71-1D</i> | MAT? <i>his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 met15Δ0 +pRS416-ADH-PRP45?</i> | tato práce |
| <i>Vps71-2A</i> | MAT? <i>his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 lys2Δ0 vps71::kanMX +pRS416-ADH-PRP45?</i> | tato práce |
| <i>Vps71-2B</i> | MAT? <i>his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 lys2Δ0 prp45(1-169)::NatMX6 +pRS416-ADH-PRP45?</i> | tato práce |

| | | |
|------------------|--|------------|
| <i>Vps71-2C</i> | MAT? <i>his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 met15Δ0 prp45(1-169)::NatMX6 vps71::kanMX +pRS416-ADH-PRP45?</i> | tato práce |
| <i>Vps71-2D</i> | MAT? <i>his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 met15Δ0 +pRS416-ADH-PRP45?</i> | tato práce |
| <i>Vps71-5A</i> | MAT? <i>his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 +pRS416-ADH-PRP45?</i> | tato práce |
| <i>Vps71-5B</i> | MAT? <i>his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 met15Δ0 prp45(1-169)::NatMX6 +pRS416-ADH-PRP45?</i> | tato práce |
| <i>Vps71-5C</i> | MAT? <i>his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 lys2Δ0 met15Δ0 vps71::kanMX +pRS416-ADH-PRP45?</i> | tato práce |
| <i>Vps71-5D</i> | MAT? <i>his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 lys2Δ0 prp45(1-169)::NatMX6 vps71::kanMX +pRS416-ADH-PRP45?</i> | tato práce |
| <i>Vps71-10A</i> | MAT? <i>his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 prp45(1-169)::NatMX6 +pRS416-ADH-PRP45?</i> | tato práce |
| <i>Vps71-10B</i> | MAT? <i>his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 met15Δ0 +pRS416-ADH-PRP45?</i> | tato práce |
| <i>Vps71-10C</i> | MAT? <i>his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 lys2Δ0 met15Δ0 prp45(1-169)::NatMX6 vps71::kanMX +pRS416-ADH-PRP45?</i> | tato práce |
| <i>Vps71-10D</i> | MAT? <i>his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 lys2Δ0 vps71::kanMX +pRS416-ADH-PRP45?</i> | tato práce |
| <i>Vps72-2A</i> | MAT? <i>his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 lys2Δ0 met15Δ0 prp45(1-169)::NatMX6 +pRS416-ADH-PRP45?</i> | tato práce |
| <i>Vps72-2B</i> | MAT? <i>his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 lys2Δ0 +pRS416-ADH-PRP45?</i> | tato práce |
| <i>Vps72-2C</i> | MAT? <i>his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 met15Δ0 prp45(1-169)::NatMX6 vps72::kanMX +pRS416-ADH-PRP45?</i> | tato práce |
| <i>Vps72-2D</i> | MAT? <i>his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 vps72::kanMX +pRS416-ADH-PRP45?</i> | tato práce |
| <i>Vps72-3A</i> | MAT? <i>his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 +pRS416-ADH-PRP45?</i> | tato práce |
| <i>Vps72-3B</i> | MAT? <i>his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 met15Δ0 prp45(1-169)::NatMX6 vps72::kanMX +pRS416-ADH-PRP45?</i> | tato práce |
| <i>Vps72-3C</i> | MAT? <i>his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 lys2Δ0 prp45(1-169)::NatMX6 vps72::kanMX +pRS416-ADH-PRP45?</i> | tato práce |
| <i>Vps72-3D</i> | MAT? <i>his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 lys2Δ0 met15Δ0 +pRS416-ADH-PRP45?</i> | tato práce |
| <i>Vps72-6A</i> | MAT? <i>his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 met15Δ0? prp45(1-169)::NatMX6 vps72::kanMX +pRS416-ADH-PRP45?</i> | tato práce |
| <i>Vps72-6B</i> | MAT? <i>his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 met15Δ0? +pRS416-ADH-PRP45?</i> | tato práce |
| <i>Vps72-6C</i> | MAT? <i>his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 lys2Δ0 met15Δ0? prp45(1-</i> | tato práce |

| | | |
|-----------------|--|------------|
| | 169)::NatMX6 +pRS416-ADH-PRP45? | |
| <i>Vps72-6D</i> | MAT? <i>his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 lys2Δ0 met15Δ0 vps72::kanMX</i> +pRS416-ADH-PRP45? | tato práce |
| <i>Vps72-8A</i> | MAT? <i>his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 vps72::kanMX</i> +pRS416-ADH-PRP45? | tato práce |
| <i>Vps72-8B</i> | MAT? <i>his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 lys2Δ0 met15Δ0</i> +pRS416-ADH-PRP45? | tato práce |
| <i>Vps72-8C</i> | MAT? <i>his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 prp45(1-169)::NatMX6</i> +pRS416-ADH-PRP45? | tato práce |
| <i>Vps72-8D</i> | MAT? <i>his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 lys2Δ0 met15Δ0 prp45(1-169)::NatMX6 vps72::kanMX</i> +pRS416-ADH-PRP45? | tato práce |
| <i>Swc3-5A</i> | MAT? <i>his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 lys2Δ0</i> +pRS416-ADH-PRP45? | tato práce |
| <i>Swc3-5B</i> | MAT? <i>his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 prp45(1-169)::NatMX6 swc3::kanMX</i> +pRS416-ADH-PRP45? | tato práce |
| <i>Swc3-5C</i> | MAT? <i>his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 lys2Δ0 met15Δ0 prp45(1-169)::NatMX6 swc3::kanMX</i> +pRS416-ADH-PRP45? | tato práce |
| <i>Swc3-5D</i> | MAT? <i>his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 met15Δ0</i> +pRS416-ADH-PRP45? | tato práce |
| <i>Swc3-10A</i> | MAT? <i>his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 lys2Δ0 met15Δ0 swc3::kanMX</i> +pRS416-ADH-PRP45? | tato práce |
| <i>Swc3-10B</i> | MAT? <i>his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 prp45(1-169)::NatMX6</i> +pRS416-ADH-PRP45? | tato práce |
| <i>Swc3-10C</i> | MAT? <i>his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 met15Δ0 prp45(1-169)::NatMX6 swc3::kanMX</i> +pRS416-ADH-PRP45? | tato práce |
| <i>Swc3-10D</i> | MAT? <i>his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 lys2Δ0</i> +pRS416-ADH-PRP45? | tato práce |
| <i>Swc3-13A</i> | MAT? <i>his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 lys2Δ0 swc3::kanMX</i> +pRS416-ADH-PRP45? | tato práce |
| <i>Swc3-13B</i> | MAT? <i>his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 met15Δ0 prp45(1-169)::NatMX6</i> +pRS416-ADH-PRP45? | tato práce |
| <i>Swc3-13C</i> | MAT? <i>his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 lys2Δ0 met15Δ0</i> +pRS416-ADH-PRP45? | tato práce |
| <i>Swc3-13D</i> | MAT? <i>his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 prp45(1-169)::NatMX6 swc3::kanMX</i> +pRS416-ADH-PRP45? | tato práce |
| <i>Swc3-15A</i> | MAT? <i>his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 met15Δ0 prp45(1-169)::NatMX6 swc3::kanMX</i> +pRS416-ADH-PRP45? | tato práce |
| <i>Swc3-15B</i> | MAT? <i>his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 lys2Δ0 met15Δ0 swc3::kanMX</i> +pRS416-ADH-PRP45? | tato práce |

| | | |
|-----------------|---|------------|
| <i>Swc3-15C</i> | MAT? <i>his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 lys2Δ0 prp45(1-169)::NatMX6 +pRS416-ADH-PRP45?</i> | tato práce |
| <i>Swc3-15D</i> | MAT? <i>his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 +pRS416-ADH-PRP45?</i> | tato práce |
| <i>Swc5-2A</i> | MAT? <i>his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 met15Δ0 +pRS416-ADH-PRP45?</i> | tato práce |
| <i>Swc5-2B</i> | MAT? <i>his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 lys2Δ0 met15Δ0 prp45(1-169)::NatMX6 swc5::kanMX +pRS416-ADH-PRP45?</i> | tato práce |
| <i>Swc5-2C</i> | MAT? <i>his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 lys2Δ0 swc5::kanMX +pRS416-ADH-PRP45?</i> | tato práce |
| <i>Swc5-2D</i> | MAT? <i>his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 prp45(1-169)::NatMX6 +pRS416-ADH-PRP45?</i> | tato práce |
| <i>Swc5-4A</i> | MAT? <i>his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 lys2Δ0 +pRS416-ADH-PRP45?</i> | tato práce |
| <i>Swc5-4B</i> | MAT? <i>his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 lys2Δ0 met15Δ0 prp45(1-169)::NatMX6 swc5::kanMX +pRS416-ADH-PRP45?</i> | tato práce |
| <i>Swc5-4C</i> | MAT? <i>his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 met15Δ0 prp45(1-169)::NatMX6 swc5::kanMX +pRS416-ADH-PRP45?</i> | tato práce |
| <i>Swc5-4D</i> | MAT? <i>his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 +pRS416-ADH-PRP45?</i> | tato práce |
| <i>Swc5-7A</i> | MAT? <i>his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 met15Δ0 prp45(1-169)::NatMX6 swc5::kanMX +pRS416-ADH-PRP45?</i> | tato práce |
| <i>Swc5-7B</i> | MAT? <i>his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 +pRS416-ADH-PRP45?</i> | tato práce |
| <i>Swc5-7C</i> | MAT? <i>his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 lys2Δ0 prp45(1-169)::NatMX6 swc5::kanMX +pRS416-ADH-PRP45?</i> | tato práce |
| <i>Swc5-7D</i> | MAT? <i>his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 lys2Δ0 met15Δ0 +pRS416-ADH-PRP45?</i> | tato práce |
| <i>Swc5-10A</i> | MAT? <i>his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 lys2Δ0 met15Δ0 swc5::kanMX +pRS416-ADH-PRP45?</i> | tato práce |
| <i>Swc5-10B</i> | MAT? <i>his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 met15Δ0 prp45(1-169)::NatMX6 swc5::kanMX +pRS416-ADH-PRP45?</i> | tato práce |
| <i>Swc5-10C</i> | MAT? <i>his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 prp45(1-169)::NatMX6 +pRS416-ADH-PRP45?</i> | tato práce |
| <i>Swc5-10D</i> | MAT? <i>his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 lys2Δ0 +pRS416-ADH-PRP45?</i> | tato práce |
| MHY90 | MATa <i>his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 met15Δ0 prp45(1-247)-3HA::NatMX6</i> | tato práce |
| MHY91 | MATa <i>his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 met15Δ0 prp45(1-330)-3HA::NatMX6</i> | tato práce |

| | | |
|-----------|--|------------|
| MHY92 | MATalfa <i>his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 prp45(1-247)-3HA::NatMX6</i> | tato práce |
| MHY93 | MATalfa <i>his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 prp45(1-330)-3HA::NatMX6</i> | tato práce |
| MHY94-1A | MAT? <i>his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 lys2Δ0 prp45(1-247)-3HA::NatMX6 +pRS416-ADH-PRP45?</i> | tato práce |
| MHY94-1B | MAT? <i>his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 lys2Δ0 met15Δ0 htz1::KanMX6 +pRS416-ADH-PRP45?</i> | tato práce |
| MHY94-1C | MAT? <i>his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 htz1::KanMX6 prp45(1-247)-3HA::NatMX6 +pRS416-ADH-PRP45?</i> | tato práce |
| MHY94-1D | MAT? <i>his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 met15Δ0 +pRS416-ADH-PRP45?</i> | tato práce |
| MHY95-2A | MAT? <i>his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 met15Δ0 prp45(1-247)-3HA::NatMX6 +pRS416-ADH-PRP45?</i> | tato práce |
| MHY95-2B | MAT? <i>his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 met15Δ0 +pRS416-ADH-PRP45?</i> | tato práce |
| MHY95-2C | MAT? <i>his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 lys2Δ0 htz1::KanMX6 prp45(1-247)-3HA::NatMX6 +pRS416-ADH-PRP45?</i> | tato práce |
| MHY95-2D | MAT? <i>his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 lys2Δ0 htz1::KanMX6 +pRS416-ADH-PRP45?</i> | tato práce |
| MHY96-10A | MAT? <i>his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 htz1::KanMX6 +pRS416-ADH-PRP45?</i> | tato práce |
| MHY96-10B | MAT? <i>his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 lys2Δ0 met15Δ0 htz1::KanMX6 +pRS416-ADH-PRP45?</i> | tato práce |
| MHY96-10C | MAT? <i>his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 prp45(1-247)-3HA::NatMX6 +pRS416-ADH-PRP45?</i> | tato práce |
| MHY96-10D | MAT? <i>his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 lys2Δ0 met15Δ0 htz1::KanMX6 prp45(1-247)-3HA::NatMX6 +pRS416-ADH-PRP45?</i> | tato práce |
| MHY97-14A | MAT? <i>his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 htz1::KanMX6 prp45(1-247)-3HA::NatMX6 +pRS416-ADH-PRP45?</i> | tato práce |
| MHY97-14B | MAT? <i>his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 lys2Δ0 htz1::KanMX6 +pRS416-ADH-PRP45?</i> | tato práce |
| MHY97-14C | MAT? <i>his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 met15Δ0 prp45(1-247)-3HA::NatMX6 +pRS416-ADH-PRP45?</i> | tato práce |

| | | |
|------------|--|------------|
| MHY97-14D | MAT? <i>his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 lys2Δ0 met15Δ0</i> +pRS416-ADH-PRP45? | tato práce |
| MHY98-3A | MAT? <i>his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 met15Δ0 prp45(1-330)-</i> 3HA::NatMX6 +pRS416-ADH-PRP45? | tato práce |
| MHY98-3B | MAT? <i>his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0</i> +pRS416-ADH-PRP45? | tato práce |
| MHY98-3C | MAT? <i>his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 lys2Δ0 htz1::KanMX6</i> +pRS416-ADH-PRP45? | tato práce |
| MHY98-3D | MAT? <i>his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 lys2Δ0 met15Δ0</i> <i>htz1::KanMX6 prp45(1-330)-3HA::NatMX6</i> +pRS416-ADH- PRP45? | tato práce |
| MHY99-6A | MAT? <i>his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 lys2Δ0 met15Δ0</i> <i>htz1::KanMX6</i> +pRS416-ADH-PRP45? | tato práce |
| MHY99-6B | MAT? <i>his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 met15Δ0 htz1::KanMX6</i> <i>prp45(1-330)-3HA::NatMX6</i> +pRS416-ADH-PRP45? | tato práce |
| MHY99-6C | MAT? <i>his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 lys2Δ0 prp45(1-330)-</i> 3HA::NatMX6 +pRS416-ADH-PRP45? | tato práce |
| MHY99-6D | MAT? <i>his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0</i> +pRS416-ADH-PRP45? | tato práce |
| MHY100-9A | MAT? <i>his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 lys2Δ0 met15Δ0</i> +pRS416-ADH-PRP45? | tato práce |
| MHY100-9B | MAT? <i>his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 prp45(1-330)-3HA::NatMX6</i> +pRS416-ADH-PRP45? | tato práce |
| MHY100-9C | MAT? <i>his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 htz1::KanMX6 prp45(1-</i> 330)-3HA::NatMX6 +pRS416-ADH-PRP45? | tato práce |
| MHY100-9D | MAT? <i>his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 lys2Δ0 met15Δ0</i> <i>htz1::KanMX6</i> +pRS416-ADH-PRP45? | tato práce |
| MHY101-14A | MAT? <i>his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 htz1::KanMX6 prp45(1-</i> 330)-3HA::NatMX6 +pRS416-ADH-PRP45? | tato práce |
| MHY101-14B | MAT? <i>his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 lys2Δ0 met15Δ0</i> <i>htz1::KanMX6</i> +pRS416-ADH-PRP45? | tato práce |
| MHY101-14C | MAT? <i>his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 lys2Δ0 met15Δ0</i> <i>prp45(1-330)-3HA::NatMX6</i> +pRS416-ADH-PRP45? | tato práce |
| MHY101-14D | MAT? <i>his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0</i> +pRS416-ADH-PRP45? | tato práce |
| MHY113-A | MAT? <i>his3Δ0 leu2Δ0 ura3Δ0 met15Δ0 htz1::KanMX6</i> | tato práce |
| MHY113-B | MAT? <i>his3Δ0 leu2Δ0 ura3Δ0 lys2Δ0</i> | tato práce |

| | | |
|----------|---|------------|
| MHY113-C | MAT? <i>his3Δ0 leu2Δ0 ura3Δ0 met15Δ0 htz1::KanMX6 prp45(1-247)-3HA::NatMX6</i> | tato práce |
| MHY113-D | MAT? <i>his3Δ0 leu2Δ0 ura3Δ0 lys2Δ0 prp45(1-247)-3HA::NatMX6</i> | tato práce |
| MHY114-A | MAT? <i>his3Δ0 leu2Δ0 ura3Δ0 met15Δ0 prp45(1-247)-3HA::NatMX6</i> | tato práce |
| MHY114-B | MAT? <i>his3Δ0 leu2Δ0 ura3Δ0 lys2Δ0 htz1::KanMX6 prp45(1-247)-3HA::NatMX6</i> | tato práce |
| MHY114-C | MAT? <i>his3Δ0 leu2Δ0 ura3Δ0 met15Δ0 htz1::KanMX6</i> | tato práce |
| MHY114-D | MAT? <i>his3Δ0 leu2Δ0 ura3Δ0 lys2Δ0</i> | tato práce |
| MHY115-A | MAT? <i>his3Δ0 leu2Δ0 ura3Δ0 htz1::KanMX6</i> | tato práce |
| MHY115-B | MAT? <i>his3Δ0 leu2Δ0 ura3Δ0 met15Δ0 prp45(1-247)-3HA::NatMX6</i> | tato práce |
| MHY115-C | MAT? <i>his3Δ0 leu2Δ0 ura3Δ0 lys2Δ0 met15Δ0</i> | tato práce |
| MHY115-D | MAT? <i>his3Δ0 leu2Δ0 ura3Δ0 lys2Δ0 htz1::KanMX6 prp45(1-247)-3HA::NatMX6</i> | tato práce |
| MHY116-A | MAT? <i>his3Δ0 leu2Δ0 ura3Δ0 lys2Δ0 met15Δ0 htz1::KanMX6 prp45(1-247)-3HA::NatMX6</i> | tato práce |
| MHY116-B | MAT? <i>his3Δ0 leu2Δ0 ura3Δ0 lys2Δ0 prp45(1-247)-3HA::NatMX6</i> | tato práce |
| MHY116-C | MAT? <i>his3Δ0 leu2Δ0 ura3Δ0 met15Δ0 htz1::KanMX6</i> | tato práce |
| MHY116-D | MAT? <i>his3Δ0 leu2Δ0 ura3Δ0</i> | tato práce |
| MHY117-A | MAT? <i>his3Δ0 leu2Δ0 ura3Δ0 lys2Δ0 met15Δ0</i> | tato práce |
| MHY117-B | MAT? <i>his3Δ0 leu2Δ0 ura3Δ0 lys2Δ0 htz1::KanMX6</i> | tato práce |
| MHY117-C | MAT? <i>his3Δ0 leu2Δ0 ura3Δ0 met15Δ0 htz1::KanMX6 prp45(1-330)-3HA::NatMX6</i> | tato práce |
| MHY117-D | MAT? <i>his3Δ0 leu2Δ0 ura3Δ0 prp45(1-330)-3HA::NatMX6</i> | tato práce |
| MHY118-A | MAT? <i>his3Δ0 leu2Δ0 ura3Δ0 met15Δ0</i> | tato práce |
| MHY118-B | MAT? <i>his3Δ0 leu2Δ0 ura3Δ0 prp45(1-330)-3HA::NatMX6</i> | tato práce |
| MHY118-C | MAT? <i>his3Δ0 leu2Δ0 ura3Δ0 lys2Δ0 htz1::KanMX6</i> | tato práce |
| MHY118-D | MAT? <i>his3Δ0 leu2Δ0 ura3Δ0 lys2Δ0 met15Δ0 htz1::KanMX6</i> | tato práce |

| | | |
|----------|--|------------|
| | <i>prp45(1-330)-3HA::NatMX6</i> | |
| MHY119-A | MAT? <i>his3Δ0 leu2Δ0 ura3Δ0 met15Δ0</i> | tato práce |
| MHY119-B | MAT? <i>his3Δ0 leu2Δ0 ura3Δ0 lys2Δ0 htz1::KanMX6 prp45(1-330)-3HA::NatMX6</i> | tato práce |
| MHY119-C | MAT? <i>his3Δ0 leu2Δ0 ura3Δ0 met15Δ0 prp45(1-330)-3HA::NatMX6</i> | tato práce |
| MHY119-D | MAT? <i>his3Δ0 leu2Δ0 ura3Δ0 lys2Δ0 htz1::KanMX6</i> | tato práce |
| MHY120-A | MAT? <i>his3Δ0 leu2Δ0 ura3Δ0 met15Δ0</i> | tato práce |
| MHY120-B | MAT? <i>his3Δ0 leu2Δ0 ura3Δ0 met15Δ0 htz1::KanMX6 prp45(1-330)-3HA::NatMX6</i> | tato práce |
| MHY120-C | MAT? <i>his3Δ0 leu2Δ0 ura3Δ0 lys2Δ0 prp45(1-330)-3HA::NatMX6</i> | tato práce |
| MHY120-D | MAT? <i>his3Δ0 leu2Δ0 ura3Δ0 lys2Δ0 htz1::KanMX6</i> | tato práce |

Bakteriální kmeny

DH5α - F⁻, Φ80dlacZΔM15, Δ(lacZYA-argF)U169, deoR, recA1, endA1, hsdR17(rk⁻,mk⁺), phoA, supE44, λ⁻, thi-1, gyrA96, relA1

4.1.2. Kultivační média a roztoky

Všechna média připravovat z deionizované vody a sterilizovat v autoklávu při 119 °C po dobu 20 minut.

- YPAD**

| | |
|----------|----------------------------|
| 20 g/l | Pepton (Merck) |
| 10 g/l | Yeast Extract (Formedium) |
| 100 mg/l | Adenine-hemisulfát (Sigma) |
| 2% | Glukóza (Sigma) |
| [20 g/l | Agar (Oxoid)] |

- SD médium**

| | |
|-----------|--|
| 6,7 g/l | Yeast Nitrogen Base without Amino acids (Difco) |
| 1,394 g/l | Synthetic Complete (Kaiser) drop-out: -His, -Leu, -Trp, -Ura (Formedium) |
| 2% | Glukóza (Sigma) |
| [20 g/l | Agar (Oxoid)] |

- SD médium se standardní koncentrací fosfátu a bez přidaného fosfátu**
 5,9 g/l Yeast Nitrogen Base without Amino acids and Phosphate (Formedium)
 1,394 g/l Synthetic Complete (Kaiser) drop-out: -His, -Leu, -Trp, -Ura (Formedium)
 2% Glukóza (Sigma)
 - SD se standardní koncentrací fosfátu: přidat KH_2PO_4 na výslednou koncentraci 7,3 mM
 - SD bez přidaného fosfátu: přidat KCl na výslednou koncentraci 7,3 mM
- SD médium s 5-fluoroorotovou kyselinou (5-FOA)**
 - připravit 2x koncentrovaný základ jako na SD médium, sterilizovat v autoklávu
 - připravit roztok 5-FOA o koncentraci 2 mg/ml, zahřívat maximálně na 65 °C, sterilizovat filtrací
 - po sterilizaci základu SD média přidat glukózu a příslušné aminokyseliny (médium musí obsahovat uracil), nechat vychladit pod 65 °C a smíchat s roztokem 5-FOA (výsledná koncentrace 5-FOA je tedy 1 mg/ml)
- Roztoky aminokyselin a uracilu (100x koncentrované roztoky)**
 - 2 g/l L-Histidin HCl monohydrát (Sigma)
 - 10 g/l L-Leucin (Sigma)
 - 2 g/l L-Tryptofan (Sigma)
 - 2 g/l L-Uracil (Sigma) - uchovávat při pokojové teplotě
 - 3 g/l L-Lysin (Sigma)
 - 2 g/l L-Methionin (Sigma)
 - 10 g/l Adenin hemisulfát (Sigma)
- Presporulační agar**
 - 20 g/l Pepton (Merck)
 - 10 g/l Yeast Extract (Formedium)
 - 4% Glukóza (Sigma)
 - 20 g/l Agar (Oxoid)
- Fowelův (sporulační agar)**
 - 5 g/l KAc
 - 2,3 g/l KCl
 - 20 g/l Agar (Oxoid)
 - přidat aminokyseliny podle potřeb daného kmene

- **Ringerův roztok**

7,5 g/l NaCl
 0,075 g/l KCl
 0,1 g/l NaHCO₃
 0,1 g/l CaCl₂

- **LB médium**

10 g/l Pepton (Merck)
 5 g/l Yeast Extract (Formedium)
 5 g/l NaCl
 [20 g/l Agar (Oxoid)]

- v případě potřeby přidat Ampicilin (100 mg/ml = 1000x koncentrovaný zásobní roztok)

4.1.3. Přehled použitých primerů

| Označení | Název | Sekvence |
|----------|-------------------------|-----------------------------------|
| OG91 | <i>ECM33</i> mRNA-F | CTCCGCTCTAGCTGCTAAC |
| OG92 | <i>ECM33</i> mRNA-R | ACCGGAGATTTTGTCCAAATCAG |
| MH72 | <i>ECM33</i> pre-mRNA-F | CTGTCATAGGATTAGGGCGAG |
| MH73 | <i>ECM33</i> pre-mRNA-R | GAAGTAGTTGAGTTAGCTGCTTAG |
| OG79 | <i>ACT1</i> mRNA-F | AATTTACTGAATTAACAATGGATTCTGAGG |
| OG80 | <i>ACT1</i> mRNA-R | GATAGATGGGAAGACAGCACG |
| OG145 | <i>ACT1</i> pre-mRNA-F | AATTTACTGAATTAACAATGGATTCTGGTA |
| OG146 | <i>ACT1</i> pre-mRNA-R | AGGTTATGGGAGAGTGAAAAATAGTA |
| OG115 | <i>TUB1</i> mRNA-F | AGAGAAGTTATTAGTATTAATGTC |
| OG116 | <i>TUB1</i> mRNA-R | TCTTCTAGATGTCCATCC |
| OG139 | <i>TUB1</i> pre-mRNA-F | AAACAATGAGAGAAGTTATTAGTATTAATGGTA |
| OG140 | <i>TUB1</i> pre-mRNA-R | TTGCGTTGAAGTTAGTAATGAAAGATG |
| OG104 | <i>TUB3</i> mRNA-F | GACAATGAGAGAGGTCATTAGTATTAATGTTG |
| OG105 | <i>TUB3</i> mRNA-R | CCTCCAAATGGCCGTCTTC |
| OG135 | <i>TUB3</i> pre-mRNA-F | GACAATGAGAGAGGTCATTAGTATTAATGGTA |
| OG136 | <i>TUB3</i> pre-mRNA-R | GAATGAATCAAACCAGATCAGATCAAAC |

| | | |
|-------|--------------------------|----------------------------------|
| OG178 | <i>APS3</i> mRNA-F | GTTACACAATGATTCATGCAGTTCTAATATTC |
| OG179 | <i>APS3</i> mRNA-R | AATTCATATACTTGCTCTAATAGCAGTTTTTG |
| OG180 | <i>APS3</i> pre-mRNA-F | GTTACACAATGATTCATGCAGTTCTAATATGT |
| OG181 | <i>APS3</i> pre-mRNA-R | GGTTGGCATTCTTATTGACTATACCAA |
| OG182 | <i>RPO26</i> mRNA-F | CAGACTACGAGGAGGCGTTTA |
| OG183 | <i>RPO26</i> mRNA-R | GTTTTTCCTCATAAGTCTCCTCATCAG |
| OG184 | <i>RPO26</i> pre-mRNA-F | AGACTACGAGGAGGCGTATG |
| OG185 | <i>RPO26</i> pre-mRNA-R | GTCGTTAAACCTGTATCACAATGATAGAAG |
| OG95 | <i>IMD4</i> mRNA-F | TCTGGCTTCCCAGTTACTGAA |
| OG96 | <i>IMD4</i> mRNA-R | AAGAATCATCTTCTAAGAATTGTATATCACGA |
| OG113 | <i>IMD4</i> pre-mRNA-F | CTTTCGTTCTACTGACTG |
| OG114 | <i>IMD4</i> pre-mRNA-R | CACACATAATGGGCTTTC |
| OG75 | <i>COF1</i> mRNA-F | CTAACAAAAGAAGATGTCTAGATCTGGTG |
| OG76 | <i>COF1</i> mRNA-R | GGTTTTAGCATCGTTCAATCCG |
| OG141 | <i>COF1</i> pre-mRNA-F | ACAAAAGAAGATGTCTAGATCTGGGTA |
| OG142 | <i>COF1</i> pre-mRNA-R | GTTCCATGTTAAAAAGGGAGGAAAGA |
| OG71 | <i>TOM22</i> -F | CGACGTTGTCGATGATGAAG |
| OG72 | <i>TOM22</i> -R | GCAACGATTCTGTCCAAC |
| KA46 | <i>RPL22A</i> mRNA-F | ATTAAGAAACAATGGCCCCAAACAC |
| KA47 | <i>RPL22A</i> mRNA-R | TGGGTCGAAGACACCGTTTTCA |
| KA138 | <i>RPL22A</i> pre-mRNA-F | TTAAGAAACAATGGCCCCAAACGTA |
| KA139 | <i>RPL22A</i> pre-mRNA-R | TTACTATCTTCCTTGTTATTCGCGTA |
| KA50 | <i>RPL22B</i> mRNA-F | CAACCACAATGGCTCCAAACAC |
| KA51 | <i>RPL22B</i> mRNA-R | ACCTCAATGGCGTTCCTAAGT |
| KA140 | <i>RPL22B</i> pre-mRNA-F | CAACCACAATGGCTCCAAACGTA |
| KA141 | <i>RPL22B</i> pre-mRNA-R | CAATGAACTGTAGGAATAGAAACTT |
| MH55 | <i>ECM33</i> A-F | TTTCGGTAGCGTGCTTGAG |
| MH56 | <i>ECM33</i> A-R | GCAAGAGAGGTCCGTTGAT |

| | | |
|-------|--|---|
| MH57 | <i>ECM33</i> B-F | ATTCAAGAACGCTTTGACTGCT |
| MH58 | <i>ECM33</i> B-R | TCGAGATTTGTGAGGAAAGAGG |
| MH59 | <i>ECM33</i> C-F | GTACTTCTGCCACTGCTACTG |
| MH60 | <i>ECM33</i> C-R | AAGATAGTCAAGGAACCATCAATCTC |
| MH70 | <i>ECM33</i> D-F | TTGGAAAGTGTCGAAGGTTTCTC |
| MH71 | <i>ECM33</i> D-R | GTAGTGTTGTCACCGTTGGAAG |
| MH61 | <i>ECM33</i> E-F | CGACTCTTCTTCCAGTAACTTCTC |
| MH62 | <i>ECM33</i> E-R | AGATGTGGCACCGTTCTTG |
| MH126 | <i>ACT1</i> A-F | TACATCAGCTTTTAGATTTTTCACG |
| MH127 | <i>ACT1</i> A-R | GCTAGAACATACCAGAATCCATTG |
| MH124 | <i>ACT1</i> B-F | AACGGTTCTGGTATGTGTAAAGC |
| MH125 | <i>ACT1</i> B-R | ACCGACGATAGATGGGAAGAC |
| OG81 | <i>ACT1</i> C-F | GATGGTGTTACTCACGTCGTTC |
| OG82 | <i>ACT1</i> C-R | GTAGTCAGTCAAATCTCTACCGGC |
| MH37 | <i>ACT1</i> D-F | GAAGGTCAAGATCATTGCTCCTC |
| MH38 | <i>ACT1</i> D-R | GAAACACTTGTGGTGAACGATAG |
| MH74 | TEL VIR-F ¹ | AAATGGCAAGGGTAAAAACCAG |
| MH75 | TEL VIR-R ¹ | TCGGATCACTACACACGGAAAT |
| OG63 | <i>PHO5</i> -F | GAGGGTCCAGGTTACGACATTATC |
| OG64 | <i>PHO5</i> -R | TAGGATATCGGTATCGTGGG |
| OG229 | <i>MAF1</i> mRNA-F | GCCTAAAGAATCACGACAATGAAATTTA |
| OG230 | <i>MAF1</i> mRNA-R | GCAACTGCCCACGATTTTACAG |
| OG231 | <i>MAF1</i> pre-mRNA-F | GCCTAAAGAATCACGACAATGAAAGTAT |
| OG232 | <i>MAF1</i> pre-mRNA-R | AACTAAGGAAGAAAAGGAGGGTTCAG |
| KM9 | integrační kazeta NatMX6 - R | GGAGAAGCTGATCCAAATGAGTGGAAGATACCTGC AGCTGTGCGGATCCCCGGGTAAATTA |
| MH195 | integrační kazeta NatMX6 pro přípravu <i>prp45</i> (1-247) - F | GCTTGCTAAAGAATCTAAATTGAAAGAATTGAGCC AACGACGGATCCCCGGGTAAATTA |
| MH196 | integrační kazeta | AAGGCATGAAGACCAGGTTTATGACAACCCACTGT |

| | | |
|------|---|--------------------------|
| | NatMX6 pro přípravu <i>prp45</i> (1-330) - F | TCGTCCGGATCCCCGGGTAAATTA |
| AV17 | kazeta NatMX6 - R | TGGTCAATAAGAGCGACCTC |
| AV18 | <i>PRP45</i> v oblasti 1-169 - F | ACAGCCACCATATTGAGGTAG |

¹ Podle (Wyce et al. 2007)

4.1.4. Použité protilátky

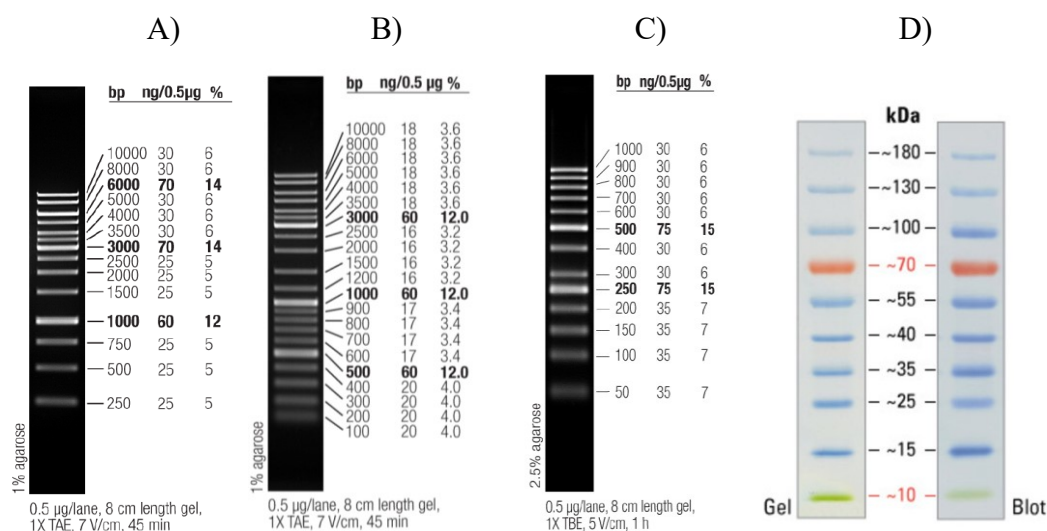
- Anti-HA.11 - Covance, katalogové číslo MMS101-R
- Anti-Rpb3 1Y26(1Y27) - Santa Cruz Biotechnology, katalogové číslo sc-101614

4.1.5. Použité soupravy pro manipulaci s nukleovými kyselinami

- MasterPure Yeast RNA Purification Kit (Epicentre)
- NucleoSpin® Plasmid (Macherey-Nagel)
- NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel)

4.1.6. Použité velikostní standardy

- GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific) - A)
- GeneRuler DNA Ladder Mix (Thermo Scientific) - B)
- GeneRuler 50 bp DNA Ladder (Thermo Scientific) - C)
- PageRuler Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific) - D)



4.1.7. Reakční směsi a programy PCR

4.1.7.1. Tvorba integračních kazet

Reakční směs: 5 µl pufru pro polymerázu Pfu-X7
5 µl MgSO₄ (zásobní koncentrace 25 mM)
5 µl dNTP (každý 2,5 mM)
1,25 µl primer F
1,25 µl primer R
1,5 µl templátové DNA
5 µl polymerázy Pfu-X7 (záleží na čistotě izolátu)
26 µl H₂O

Program PCR: 1. 95 °C, 5 min
2. 95 °C, 30 s
3. 43 °C, 30 s
4. 68 °C, 3 min (záleží na délce amplifikovaného úseku)
kroky 2 - 4 opakovat 10x
5. 95 °C, 30 s
6. 43 °C, 30 s
7. 72 °C, 3 min + 5 s navíc při každém cyklu
kroky 5 - 7 opakovat 20x
8. 72 °C, 5 min
9. 15 °C, for ever

4.1.7.2. PCR z kolonií

Reakční směs: 1,5 µl pufru pro polymerázu Taq
1,5 µl MgCl₂ (zásobní koncentrace 25 mM)
1,5 µl dNTP (každý 2,5 mM)
0,375 µl primer F
0,375 µl primer R
0,15 µl polymerázy Taq (záleží na čistotě izolace)
2 µl templátu
7,6 µl H₂O

Program PCR: 1. 95 °C, 5 min
2. 95 °C, 15 s
3. 60 °C, 15 s (záleží na teplotě tání primerů)
4. 72 °C, 1 min na 1 kbp amplifikovaného úseku
kroky 2 - 4 opakovat 25 - 35x
5. 72 °C, 5 min
6. 10 °C, 5 min

10x Pufr pro polymerázu Pfu-X7: 200 mM Tris-HCl, pH 8,8
100 mM KCl
1% Triton X-100
1 mg/ml BSA bez nukleáz

10x Pufr pro polymerázu Taq s KCl: 100 mM Tris-HCl, pH 8,8
500 mM KCl
0,8% (v/v) Nonidet P-40

10x Pufr pro polymerázu Taq s $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$: 750 mM Tris-HCl, pH 8,8
200 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
0,1% (v/v) Tween-20

4.2. Metody

4.2.1. Kultivace kvasinkových kmenů

4.2.1.1. Kultivace v tekuté kultuře

- kmeny standardně kultivovány v Erlenmayerových baňkách v příslušném médiu při 30 °C na třepačce při 180 rpm
- množství použitého média odpovídá desetíně až pětíně objemu baňky
- nárůst kultury stanovován pomocí přístroje CO8000 Cell Density Meter (WPA Biowave); všechny hodnoty optické density (OD) uvedené v této práci odpovídají tomuto přístroji; exponenciální fázi odpovídají hodnoty OD ~ 0,3 až ~ 3

4.2.1.2. Kultivace na pevném médiu

- buňky standardně kultivovány 2 - 3 dny na Petriho miskách s příslušným pevným médiem při 30 °C

4.2.2. Měření růstové křivky pomocí přístroje Varioskan

- Večer buňky zaočkovat do 5 ml příslušného média, kultivovat na třepačce přes noc při 30 °C při 180 rpm.
- Ráno přeočkovat na OD ~ 0,05 do 5 ml příslušného média.
- Do jamiček 12-jamkové mikrotitrační destičky napipetovat v duplikátu 1,4 ml kultury a vložit do přístroje Varioskan (Thermo Scientific).
- Měřit obvykle 24 hodin při příslušné teplotě. OD při 600 nm odečíst každých 10 minut, mezi intervaly třepat při 180 rpm při rozkmitu 20 mm.
- Růstové křivky vyhodnotit pomocí programu Excel.

4.2.3. Fosfátové přenosy

- Večer zaočkovat buňky do 10 ml SD média se standardní koncentrací fosfátu (dále v návodu označovaného jako fosfátové médium), kultivovat na třepačce přes noc při 30 °C a 180 rpm.
- Ráno kulturu přeočkovat do 40 ml fosfátového média na OD ~ 0,75 a pokračovat v kultivaci, dokud kultura nedosáhne OD ~ 2,1.
- Po dosažení OD 2,1 buňky opět přeočkovat do 60 ml fosfátového média na OD ~ 0,6 a kultivovat do dosažení OD ~ 1,5.
- Provést odběr “před promytím” a tento odběr zpracovat (viz dále).
- Na základě OD kultury spočítat, jaký objem je nutné odebrat, aby po resuspendování buněk do 30 ml bylo OD kultury 1,5. Tento objem odebrat do dvou 50ml centrifugačních zkumavek.
- Kultury centrifugovat (1000 g, 3 min, pokojová teplota) a supernatant odstranit.
- Pelet v jedné centrifugační zkumavce resuspendovat ve 45 ml fosfátového média a pelet v druhé centrifugační zkumavce resuspendovat ve 45 ml média bez přidaného fosfátu. Kultury centrifugovat (1000 g, 3 min, pokojová teplota) a supernatant odstranit. Propláchnutí ještě jednou zopakovat.
- Sediment buněk proplachovaný fosfátovým médiem resuspendovat do 30 ml fosfátového média, sediment buněk proplachovaný médiem bez přidaného fosfátu resuspendovat do 30 ml média bez přidaného fosfátu. Kultury přenést do Erlenmeyerovy baňky, umístit na třepačku a kultivovat (30 °C, 180 rpm).

Provádění a zpracování odběrů

- V určitých časech provádět odběry. Odebírat vždy 2 ml kultury do 2ml mikrozukmavky.
- Kulturu ihned centrifugovat (16 000 g, 1 min, pokojová teplota), supernatant odstranit a pelet zamrazit v tekutém dusíku. Skladovat při -75 °C.

4.2.4. Kapkový test

- Buňky večer zaočkovat do 5 ml příslušného média, kultivovat na třepačce přes noc při 30 °C při 180 rpm.
- Ráno přeočkovat do 5 ml média na OD ~ 0,3 a kultivovat do dosažení OD ~ 0,9 - 2,5.
- Odebrat takové množství buněk, které odpovídá 1 ml o OD 0,9. Buňky usadit centrifugací (pokojová teplota, 16 000 g, 30 s), supernatant odstranit a buňky resuspendovat do 500 µl sterilní deionizované vody.
- Do jamek 96-jamkové mikrotitrační destičky napipetovat 200 µl sterilní deionizované vody. Do první jamky přidat 50 µl buněčné suspenze, opakovaným nasáváním a vysáváním promíchat a 50 µl této suspenze napipetovat do další jamky. Takto vytvořit ředící řadu s ředícím faktorem 5.

- Pomocí “Replica plater for 96-well plate” (Sigma) sterilizovaného namočením v lihu a opálením nanést buňky na příslušná pevná média v Petriho misce
- Buňky kultivovat v termostatu v příslušné teplotě a fotografovat po 2, 3 a 6 dnech.

4.2.5. Příprava glycerolových konzerv a jejich výsev

- K suspenzi kvasinkových buněk v deionizované vodě nebo médiu přidat 60% glycerol na výslednou koncentraci 30 %.
- Zamíchat překlápěním zkumavky a přenést do -75 °C, tamtéž uchovávat.
- Při výsevu mikrobiologickou kličkou nebo sterilním párátkem seškrábnout trochu vrchní části zmrzlé suspenze na Petriho misku s příslušným médiem a kultivovat při 30 °C. Vše provádět rychle, aby suspenze ve zkumavce nerozmrzla.

4.2.6. Křížení, sporulace a mikromanipulace spor

- Kmeny *S. cerevisiae* opačného párovacího typu resuspendovat do 20 µl vody a tyto suspenze kápnout přes sebe na Petriho misku s médiem YPAD. Inkubovat nejméně 4 hodiny při 30 °C.
- Narostlou biomasu přenést na selekční médium, které umožní vyrůst pouze diploidním jedincům. Inkubovat při 30 °C.
- Diploidní kmen hustě nanést na Petriho misku s presporulačním agarem a kultivovat při 30 °C do druhého dne.
- Biomasu kvantitativně přenést do zkumavky s 500 µl vody. Centrifugovat (16 000 g, 30 s, pokojová teplota), supernatant odstranit a k sedimentu přidat takové množství Ringerova roztoku, aby vznikla hustá, ale ještě pipetovatelná suspenze (cca 10 - 20 µl).
- Suspenzi nanést na misku se sporulačním agarem.
- Inkubovat 4 - 10 dní při pokojové teplotě, průběžně mikroskopicky kontrolovat množství vzniklých věreck.
- Malé množství buněčné suspenze ze sporulačního média přenést do 50 µl roztoku Yeast lytic enzyme (5 mg/ml). Inkubovat 4 minuty při pokojové teplotě. Poté k roztoku přidat 1 ml vody.
- Ke kraji misky s médiem YPAD nanést 25 µl buněčné suspenze a rozetřít sterilní skleněnou tyčinkou. Po zaschnutí suspenze na misce oddělovat jednotlivá věrecka a spory pomocí mikromanipulátoru (Singer Instruments).

4.2.7. Transformace kvasinek lithium-acetátovou metodou

4.2.7.1. Příprava kompetentních buněk

- Buňky večer zaočkovat do 5 - 10 ml média YPAD a kultivovat přes noc na třepačce při 30 °C a 180 rpm.

- Ráno buňky přeočkovat do 10 ml média YPAD na OD ~ 0,3 a kultivovat do dosažení OD ~ 1,2 - 1,8 (tj. $1,3 - 2,5 \times 10^7$ buněk na 1 ml kultury).

4.2.7.2. *Vlastní transformace*

- Na jednu transformaci odebrat takové množství kultury, které obsahuje 10^8 buněk. Kulturu centrifugovat (3 min, 1000 g, pokojová teplota), supernatant odstranit a buněčný pelet resuspendovat do 10 ml vody. Znovu centrifugovat a buněčný pelet resuspendovat do 1 ml vody. Přenést do mikrozkušavky.
- Buněčnou suspenzi v mikrozkušavce centrifugovat a supernatant odstranit. K peletu přidat: 73 μ l vody
 36 μ l 1M LiAc
 10 μ l ssDNA (10 mg/ml, čerstvě denaturovaná povařením)
 1 μ l plazmidové DNA (> 100 ng)
 240 μ l PEG 3500 (Sigma) 50% w/v
- Suspenzi zamíchat pomocí vortexu.
- Inkubovat 40 min při 42 °C, občas zamíchat překlápěním zkumavky.
- Suspenzi centrifugovat, supernatant odstranit. Buněčný pelet resuspendovat ve vodě a vysévat na Petriho misku s příslušným selekčním médiem.

4.2.8. **Transformace *E. coli* elektroporací**

4.2.8.1. *Příprava elektrokompetentních buněk*

- Zaočkovat 20 ml LB média kmenem *E. coli*, kultivovat přes noc při 37 °C, 180 rpm.
- Ráno kulturu přeočkovat na OD 0,15 do 4x 250 ml média LB. Kulturu inkubovat na třepačce, dokud nedosáhne OD ~ 2.
- Kultury v Erlenmayerových baňkách přenést na led a nechat cca 10 min chladit. Od tohoto kroku vše provádět na ledu.
- Kultury přelit do 250ml centrifugačních zkumavek (Nalgene), usadit centrifugací (10 min, 3 000 g, 4 °C), supernatant slít.
- Sediment propláchnout 100 ml vychlazené vody (lze spojit buněčné suspenze ze dvou centrifugačních zkumavek do jedné), opět centrifugovat, supernatant slít.
- Sediment resuspendovat v 50 ml vychlazené vody, přenést do 50ml centrifugačních zkumavek, centrifugovat, supernatant slít.
- Sediment resuspendovat v 25 ml 10% (w/w) vychlazeného glycerolu, centrifugovat, supernatant odstranit. Promytí glycerolem je možné ještě jednou zopakovat.
- Sediment resuspendovat v malém množství 10% vychlazeného glycerolu, aby vznikla hustá, ale ještě pipetovatelná suspenze.
- Suspenzi rozplnit po 100 - 200 μ l do 1,5ml mikrozkušavek vychlazených v tekutém dusíku, do kterého lze mikrozkušavky dočasně odkládat. Poté přenést do -75 °C a tamtéž dlouhodobě skladovat.

4.2.8.2. *Vlastní transformace*

- Do zkumavky s 0,5 - 2 μ l plazmidové DNA nebo ligační směsí přidat 50 μ l elektrokompetentních buněk.
- Suspenzi zamíchat a přenést na dno vychlazené elektroporační kyvety (vzdálenost mezi elektrodami 2 mm, Cell Projects), kyvetu zvenku osušit.
- Kyvetu vložit do přístroje Gene Pulser Apparatus (Bio-Rad) a nastavit hodnoty kapacity 25 μ F, napětí 2,5 kV a odpor 200 Ω . Aplikovat puls. Časová konstanta by měla být mezi 4 až 5 ms.
- Obsah kyvety okamžitě resuspendovat do 200 μ l média LB (může být s 0,5% glukózou), převést do mikrozkušavky a inkubovat 60 min při 37 °C a 1000 rpm v třepacím bloku (Thermomixer Comfort, Eppendorf).
- Na misky s médiem LB se selekčním antibiotikem vysévat 2, 20 a 200 μ l kultury. Inkubovat přes noc při 37 °C.

4.2.9. **Příprava proteinových extraktů**

- Buňky zaočkovat do 5 ml média, přes noc inkubovat na třepačce při 30 °C, 180 rpm.
- Ráno buňky přeočkovat do 15 ml média na OD 0,3 a inkubovat při 30 °C, 180 rpm do dosažení OD 0,9 - 3.
- Objem, který odpovídá 10 ml o OD 0,9 převést do 15ml centrifugační zkumavky a centrifugovat (3 min, 1000 g, pokojová teplota).
- Supernatant odstranit, buněčný pelet resuspendovat do 1 ml vody a přenést do 1,5ml mikrozkušavky. Centrifugovat (30 s, 16 000 g, pokojová teplota), supernatant odstranit a pelet na 10 - 15 min zamrazit do -75 °C. Skladovat lze tamtéž.
- K sedimentu přidat 100 μ l čerstvě namíchaného roztoku 1,85 M NaOH se 7 % β -mercaptoethanolem (= 93 μ l 2M NaOH + 7 μ l 100% β -mercaptoethanolu) a směs intenzivně míchat na vortexu 4x 30 s. Mezi jednotlivými pulzy inkubovat na ledu.
- K suspenzi přidat 100 μ l 50% kyseliny trichloroctové, krátce promíchat pomocí vortexu a inkubovat 5 min na ledu.
- Centrifugovat 10 min, 14 000 g, 4 °C. Supernatant odstranit, sediment důkladně resuspendovat v 500 μ l 1M nepufrovaného Tris a ihned znovu centrifugovat (1 min, 14 000 g, 4 °C).
- Supernatant odstranit a sediment resuspendovat v stejném objemu 2x Laemmli pufru. Zamrazit do -75 °C.
- Před nanášením na gel přidat 1/20 objemu suspenze 1M DTT a inkubovat 5 min při 95 °C.

2x Laemmli pufr: 0,112 M Tris-HCl, pH 6,8
 3,42% SDS
 12% (v/v) glycerol
 0,002% bromfenolová modř

4.2.10. Tris-glycinová SDS-PAGE s využitím soupravy Bio-Rad Mini Protean II/III Cell

- Podle návodu k soupravě sestavit aparaturu na přípravu gelů.
- Připravit separační gel podle tabulky (rozpis je na gel o tloušťce 0,75 mm):

| Chemikálie (objem v ml) | Výsledná koncentrace akrylamidu v separačním gelu | | |
|--------------------------------|---|--------|--------|
| | 7,5% | 10% | 12% |
| H₂O | 2,5 | 2,08 | 1,75 |
| 4x Tris-HCl/SDS, pH 8,8 | 1,25 | 1,25 | 1,25 |
| AA/BIS | 1,25 | 1,67 | 2,00 |
| TEMED | 0,034 | 0,034 | 0,034 |
| 10% (w/v) APS | 0,0165 | 0,0165 | 0,0165 |

- TEMED a APS přidávat těsně před nanášením, důkladně promíchat. Nanášet stříkačkou s ušřízenou žlutou špičkou tak, aby v aparatuře zbylo místo na nanesení zaostřovacího gelu (cca 5 mm).
- Gel převrstvit vodou nebo izopropanolem, aby se zabránilo přístupu vzduchu, který polymeraci inhibuje.
- Po zpolymerování gelu vodu nebo izopropanol důkladně odsát.
- Připravit zaostřovací gel (rozpis je pro gel o tloušťce 0,75 mm):

| Chemikálie | Objem (ml) |
|--------------------------------|------------|
| H₂O | 1,550 |
| 4x Tris-HCl/SDS, pH 6,8 | 0,625 |
| AA/BIS | 0,325 |
| TEMED | 0,0025 |

| | |
|----------------------|--------|
| 10% (w/v) APS | 0,0125 |
|----------------------|--------|

- TEMED a APS opět přidávat těsně před nanášením, promíchat. Gel nanést stříkačkou s ustřiženou žlutou špičkou cca 1 mm pod okraj skla, vložit hřebínek tak, aby v jamkách nezůstaly bubliny.
- Po ztuhnutí gelu hřebínek vytáhnout a jamky promýt elektroforézovým pufrům, aby se vymyly případné kousky gelu.
- Podle návodu k soupravě sestavit aparaturu.
- Prostor mezi gely naplnit elektrodoým pufrům, ověřit, že neprotéká, a nanést vzorky.
- Elektrodoým pufrům naplnit prostor kolem gelů v hlavní vaně.
- Aparaturu připojit ke zdroji napětí. Rozdělení provádět při konstantním proudu 10 mA/0,75 mm gel, po vstupu vzorků do separačního gelu lze zvýšit na 20 mA/0,75 mm gel.
- Po rozdělení vzorků odpojit aparaturu od zdroje napětí, rozebrat ji a případně označit gely pro zachování orientace nanášek.
- Dále pokračovat barvením gelů (inkubovat minimálně 20 min v roztoku Coomassie brilliant blue R 250, poté odbarvit v odbarvovacím roztoku) nebo přenosem proteinů na membránu metodou Western blot.

AA/BIS: 30% roztok (Sigma)

4x Tris-HCl/SDS, pH 8,8: 1,5 M Tris-HCl
0,4% SDS

Tris base rozpustit do 300 ml vody, pH dorovnat 1N HCl na 8,8, doplnit na 500 ml, přefiltrovat přes 0,45 µm filtr, přidat 2 g SDS, skladovat při 4 °C

4x Tris-HCl/SDS, pH 6,8: 0,5 M Tris-HCl
0,4% SDS

Tris base rozpustit do 40 ml vody, pH dorovnat 1N HCl na 6,8, doplnit vodou na objem 100 ml, přefiltrovat přes 0,45 µm filtr, přidat 0,4 g SDS, skladovat při 4 °C

5x elektrodoý pufr: 125 mM Tris-HCl, pH 8,3
950 mM glycín
0,5% SDS

10% APS: $\text{NH}_4\text{S}_2\text{O}_8$, rozpouštět čerstvě

Barvicí roztok: 20% methanol
0,117% (v/v) Coomassie Brilliant Blue R-250 (Bio-Rad)
0,051% (v/v) Bismarck Brown R (Sigma)
7% kyselina octová v H_2O

Odbarvovací roztok: 20% methanol
7% kyselina octová v H₂O

4.2.11. Western blot

4.2.11.1. Pomocí Bio-Rad Trans-Blot®

- Připravit si 2 papíry Whatman (3 mm) o rozměrech 11 x 8 cm, nitrocelulózovou membránu (Bio-Rad) a Petriho misky o průměru 18 cm s cca 100 ml chlazeného přenosového pufru.
- Membránu nechat sytit pod hladinou přenosového pufru cca 5 min.
- Do Petriho misky s přenosovým pufrem umístit aparaturu pro skládání “sendviče” tak, aby byla černá blotovací deska dole a pod hladinou pufru. Na černou blotovací desku položit porézní vložku, nechat nasáknout přenosovým pufrem a vytlačit z ní vzduch.
- Na porézní vložku položit namočený papír Whatman, pak gel, membránu, druhý papír Whatman a druhou porézní vložku předem nasáknutou přenosovým pufrem. Celou sestavu přidržet, válečkem vytlačit vzduchové bublinky, uzavřít a zasunout do držáku blotovacích desek v aparatuře tak, aby čirá deska směřovala k + pólu (červený) a černá k - pólu (černý).
- Do elektroforézové vany nalít přenosový pufr, vložit nádobku s ledem, míchadélko a celou vanu položit na magnetickou míchačku. Připojit zdroj napětí a blotovat při konstantním napětí 90 - 110 V hodinu až hodinu a půl. Každou půl hodinu je potřeba vyměnit nádobku s ledem.
- Po skončení přenosu odpojit zdroj napětí a “sendvič” rozebrat. Gel obarvit v barvicím roztoku a membránu opláchnout v pufru TBS. Membránu lze skladovat zatavenou v PE folii při 4 °C nebo ihned provést imunodetekci protilátkou.

1x přenosový pufr: 25mM Tris
192 mM glycín
20% (v/v) methanol

4.2.11.2. Pomocí Bio-Rad Trans-Blot® Turbo

- Do aparatury Trans-Blot® Turbo položit papír Whatman (Bio-Rad, Extra Thick Blot Filter Paper, Precut, 7.5 x 10 cm #1703965) a trochu ho navlhčit v přenosovém pufru. Na něj položit membránu, gel a druhý papír Whatman, opět ho navlhčit přenosovým pufrem.
- Jeden 0,75mm gel blotovat 15 min při 1,25 A a 25 V.
- Po skončení přenosu aparaturu rozebrat, gel obarvit v barvicím roztoku a membránu opláchnout v pufru TBS. Membránu lze skladovat zatavenou v PE folii při 4 °C nebo ihned provést imunodetekci protilátkou.

5x přenosový pufr: 1,5M Tris
1,5M glycine
0,125% SDS

4.2.12. Imunodetekce proteinů na membráně

- Membránu blokovat 1 hodinu v 5% Blotting-Grade Blocker (Bio-Rad)/0,1% TTBS mírným mícháním na kývačce.
- Membránu zatavit do polyethylenové folie, přidat 3 - 7 ml roztoku primární protilátky (ředěné v 5% Blotting-Grade Blocker/0,1% TTBS) a inkubovat 1 hodinu na kývačce při pokojové teplotě a dále při 4 °C přes noc.
- Po skončení inkubace membránu opláchnout v TTBS, poté odmývat 3x10 min v TTBS.
- Membránu opět zatavit do polyethylenové folie, přidat 3 - 7 ml sekundární protilátky (ředěnou v 3% Blotting-Grade Blocker/0,05% TTBS) a inkubovat 1 hodinu při pokojové teplotě.
- Po skončení inkubace membránu opláchnout 3x 10 min v TTBS a 2x 5 min v TBS.

TBS: 20mM Tris-HCl, pH 8,0
500mM NaCl

TTBS: TBS s 0,05% Tween 20, pokud není specifikováno jinak (Serva)

4.2.12.1. Vizualizace signálu pomocí alkalické fosfatázy

- Membránu opláchnout v pufru AP, položit do vyvíjecího roztoku a inkubovat ve tmě do vybarvení.
- Vyvíjení zastavit promytím v destilované vodě.

Pufr AP: 100mM Tris-HCl, pH 9,5
0,5 mM MgCl₂

Vyvíjecí roztok: naředit reagensie A a B (Bio-Rad) v pufru AP
100x reagensie A - 30 mg NBT v 70% DMF
100x reagensie B - 15 mg BCIP v H₂O

4.2.12.2. Vizualizace pomocí křenuvé peroxidázy

Pomocí přístroje LAS-4000 (GE Healthcare)

- Membránu osušit položením na filtrační papír.

- Membránu inkubovat v substrátech ECL Detection Reagent (GE Healthcare) smíchaných v poměru 1:1, vložit do eurodesek a umístit pod kameru do přístroje LAS-4000.
- Nejprve fotografovat ve viditelném světle (metoda EPI), poté detekovat chemiluminiscenci v intervalech dle potřeby (10 s - 3 min).

4.2.13. Izolace chromozomální DNA z kvasinek

- Kvasinkovou kulturu (10 - 20 ml) nechat narůst do stacionární fáze (OD ~ 9).
- Kulturu přelít do 50ml centrifugační zkumavky, centrifugovat (1000 g, 3 min, pokojová teplota), supernatant slít, buňky resuspendovat v 500 µl vody a převést do 1,5ml mikrozukavky se šroubovacím víčkem. Krátce centrifugovat, supernatant slít.
- Přidat 200 µl lyzačního pufru, 200 µl směsi fenol:chloroform:izoamylalkohol (25:24:1) a ~300 mg skleněných kuliček.
- Buňky desintegrovat vortexováním po dobu 3 - 4 minut. Poté přidat 200 µl pufru TE (pH 8).
- Centrifugovat 20 000 g, 5 min při pokojové teplotě. Vodnou fázi převést do čisté mikrozukavky.
- Přidat 1 ml 96% ethanolu, promíchat překlápěním (ne s využitím vortexu!), centrifugovat 20 000 g, 2 min při pokojové teplotě, supernatant odstranit.
- Sediment resuspendovat ve 400 µl pufru TE, přidat 3 µl RNázy A (10 mg/ml) a inkubovat 5 min ve 37 °C.
- K roztoku přidat 10 µl 4M NH₄Ac a 1 ml 96% ethanolu. Promíchat překlápěním a případně inkubovat 1 hodinu při -20 °C.
- Centrifugovat 20 000 g, 2 min při 4 °C. Sediment 2x promýt 70% ethanolem a resuspendovat v 50 µl vody.

Lyzační pufr: 10 mM Tris-HCl, pH 8

1 mM EDTA
2% Triton X-100
1% SDS
100 mM NaCl

4.2.14. Izolace plazmidové DNA alkalickou metodou - "midiprep"

- Na selekční antibiotikum zaočkovat bakteriální kmen *E. coli* nesoucí příslušný plasmid. Inkubovat přes noc při 37 °C.
- K večeru zaočkovat kolonií 10 - 50 ml média LB s příslušným selekčním antibiotikem. Inkubovat v Erlenmayerově baňce na třepačce při 37 °C, 180 rpm přes noc.

- Narostlou bakteriální kulturu ochladit na ledu, převést ji do 50ml centrifugační zkumavky a centrifugovat 3000 g, 15 min, 4 °C.
- Sediment dokonale resuspendovat do x ml roztoku I, uchovávat na ledu. Množství zvolit podle nárůstu a výchozího objemu kultury, obvykle 0,5 - 1 ml pro 10 ml kultury, 2 - 4 ml pro 50 ml kultury.
- Zkumavky vyjmout z ledu a přidat 2x ml roztoku II, promíchat překlápěním zkumavky a inkubovat při pokojové teplotě 1 - 5 min.
- Znovu přenést na led, přidat 1,5x ml roztoku III, promíchat a inkubovat 30 - 60 min na ledu.
- Bílou sraženinu usadit centrifugací (16 000 g, 15 min, 4 °C). Supernatant převést do čisté centrifugační zkumavky, smísit s 0,6 objemu izopropanolu a znova centrifugovat (16 000 g, 5 min, 4 °C).
- Supernatant slít, sediment vysušit, rozpustit do 300 µl deionizované vody a přepipetovat do mikrozukavky.
- Smísit se stejným objemem 10M LiCl a inkubovat 30 - 60 min při -20 °C.
- Sraženinu usadit centrifugací (16 000 g, 5 min, 4 °C), supernatant převést do čisté mikrozukavky.
- Izolovanou plazmidovou DNA vysrážet jedním objemem 96% ethanolu, inkubovat 60 min při -20 °C.
- Sraženinu usadit centrifugací (16 000 g, 5 min, 4 °C), supernatant odstranit, sediment opláchnout v 70% ethanolu, znovu centrifugovat, supernatant důkladně odstranit a sediment vysušit.
- Rozpustit ve 30 - 200 µl vody, množství a kvalitu izolované DNA zjistit elektroforeticky a pomocí přístroje Nanodrop (Thermo Scientific).

Roztok I: 25 mM Tris-HCl, pH 8

10 mM EDTA

1% glukóza

Roztok II: 1% SDS

0,2 M NaOH

Roztok III: 3M KAc

2M kyselina octová, pH 5,4

4.2.15. Izolace plazmidové DNA alkalickou metodou - "miniprep"

- Na plotnu se selekčním antibiotikem zaočkovat bakteriální kmen *E. coli* nesoucí příslušný plasmid. Inkubovat přes noc při 37 °C.
- K večeru zaočkovat kolonií 4 ml média LB s příslušným selekčním antibiotikem. Inkubovat v Erlenmayerově baňce na třepačce při 37 °C, 180 rpm přes noc.

- 2 ml narostlé bakteriální kultury přenést do 2ml mikrozkušavky, centrifugovat (16 000 g, 1 min, RT), supernatant odstranit. Do té samé mikrozkušavky přidat zbylé 2 ml kultury, centrifugaci opakovat, supernatant odstranit.
- Buněčný pelet důkladně resuspendovat ve 300 µl roztoku I (složení roztoků viz výše).
- Přidat 600 µl roztoku II a zamíchat překlápěním zkumavky. Inkubovat 5 min při pokojové teplotě.
- Přidat 450 µl roztoku III, pořádně promíchat a inkubovat 5 min na ledu.
- Vysrážené proteiny usadit centrifugací (16 000 g, 1 min) a supernatant přepipetovat do čisté 2ml mikrozkušavky.
- K supernatantu přidat 810 µl izopropanolu, důkladně promíchat a centrifugovat (16 000 g, 1 min). Supernatant slít, zkumavku postavit dnem vzhůru na čistou buničinu a pelet nechat vyschnout.
- Pelet rozpustit rozpustit ve 300 µl vody.
- K suspenzi přidat 150 µl nasyceného roztoku LiCl (nebo 1 objem 10M LiCl) a inkubovat 5 min na ledu.
- Vzorek centrifugovat (16 000 g, 1 min) a supernatant přenést do čisté mikrozkušavky. Přidat stejný objem 96 % EtOH a 5 min inkubovat na ledu.
- Vysráženou DNA usadit centrifugací (16 000 g, 1 min), supernatant odstranit, pelet opláchnout 70% EtOH, znovu centrifugovat, supernatant pořádně odstranit a nechat vyschnout.
- Plazmidovou DNA rozpustit do 30 - 50 µl vody, množství a kvalitu izolované DNA zjistit elektroforeticky a pomocí přístroje Nanodrop (Thermo Scientific).

4.2.16. Extrakce DNA pro aplikace PCR pomocí LiAc/SDS

4.2.16.1. Provedení ve zkumavce (dle (Løøke et al. 2011), upraveno)

- Párátkem nabrat množství biomasy odpovídající špendlíkové hlavičce, resuspendovat do 100 µl roztoku LiAc/SDS a inkubovat 15 min při 70 °C.
- Po skončení inkubace přidat 300 µl 96% EtOH, zamíchat pomocí vortexu a vysráženou DNA usadit centrifugací (16000 g, 3 min, pokojová teplota). Supernatant odstranit.
- Pelet opláchnout 70% EtOH, znovu centrifugovat, supernatant důkladně odstranit, nechat vyschnout.
- Usazenou DNA rozpustit ve 100 µl vody, opět centrifugovat a 1 µl supernatantu použít jako templát pro PCR.

1x LiAc/SDS: 200 mM octan lithný
1% SDS

4.2.16.2. *Provedení v destičce*

- Do jamek destičky rozplnit 60 μ l vody. Pomocí párátko přidat množství biomasy odpovídající polovině špendlíkové hlavičky a přidat 60 μ l 2x koncentrovaného roztoku LiAc/SDS.
- Inkubovat 15 min při 70 °C.
- Přidat 120 μ l izopropanolu a centrifugovat (2250 g, 5 min, pokojová teplota).
- Supernatant odstranit a sediment nechat sušit 5 min při 37 °C v termostatu.
- Vysráženou a vysušenou DNA rozpustit do 100 - 200 μ l vody, 1 μ l použít jako templát pro PCR.

4.2.17. **Izolace celkové RNA z kvasinek**

4.2.17.1. *Pomocí MasterPure™ Yeast RNA Purification Kit (Epicentre)*

Je potřeba dodržovat zásady práce s RNA, veškerý plast sterilizovat 3x v autoklávu, vodu ošetřit pomocí DEPC (Sigma; 1 ml na 1 l vody, inkubovat přes noc, DEPC inaktivovat sterilizací v autoklávu).

- Rozmrazit připravenou buněčnou biomasu skladovanou při -80 °C nebo připravit čerstvou. Optimální množství na izolaci odpovídá 1 ml buněk ve střední logaritmické fázi růstu.
- Na každý vzorek si připravit směs 300 μ l Extraction Reagent for RNA a 1 μ l Proteinase K (50 μ g/ μ l), tuto směs přidat ke vzorkům a důkladně resuspendovat.
- Inkubovat 15 min při 70 °C, každých 5 min zamíchat vortexováním.
- Po skončení inkubace vzorky přenést na led a inkubovat 5 min. Poté přidat 175 μ l MPC Protein Precipitation Reagent a intenzivně zamíchat vortexováním (aspoň 10 s).
- Vzorky centrifugovat (20 000 g, 10 min, 4 °C).
- Supernatant převést do čisté mikrozkušavky a přidat 500 μ l izopropanolu. Zamíchat překlápěním zkumavky (30 - 40x).
- Vysráženou RNA usadit centrifugací (viz výše), izopropanol důkladně odstranit.
- Pro odstranění kontaminující DNA pelet rozpustit v roztoku sestávajícím ze 175 μ l deionizované vody zbavené RNáz, 20 μ l 10x DNase Buffer a 5 μ l RNase-Free DNase I (1 U/ μ l).
- Inkubovat 30 min při 37 °C.
- Po skončení inkubace ke vzorkům přidat 200 μ l 2x T and C Lysis Solution a důkladně promíchat vortexováním (5 s).
- Přidat 200 μ l MPC Protein Precipitation Reagent a opět důkladně promíchat vortexováním (10 s), poté inkubovat 5 min na ledu.
- Vzorky centrifugovat (viz výše) a supernatant přepipetovat do čisté mikrozkušavky.

- K supernatantu přidat 500 µl izopropanolu, promíchat překlápěním zkumavky (30 - 40x).
- Pomocí centrifugace (viz výše) usadit vysráženou RNA, supernatant důkladně odsát.
- Pelet 2x opláchnout 70% EtOH, EtOH důkladně odstranit a pelet nechat vyschnout.
- Pelet resuspendovat do 35 µl deionizované vody zbavené RNáz a ke každému vzorku přidat 1 µl RiboGuard™ RNase Inhibitor.
- Kvalitu a množství vyizolované RNA zjistit pomocí přístroje Nanodrop (Thermo Scientific).
- Skladovat při -80 °C.

4.2.17.2. *Izolace RNA na sekvenační analýzu*

Je potřeba dodržovat zásady práce s RNA, veškerý plast sterilizovat 3x v autoklávu, vodu ošetřit pomocí DEPC (Sigma; 1 ml na 1 l vody, inkubovat přes noc, DEPC inaktivovat sterilizací v autoklávu).

- Večer zaočkovat 5 ml média příslušným kvasinkovým kmenem. Inkubovat na třepačce při 30 °C a 180 rpm přes noc.
- Ráno kulturu přeočkovat do 10 ml média na OD ~ 0,3 a inkubovat na třepačce (30 °C, 180 rpm) do dosažení OD ~ 0,8 - 1,5.
- Kulturu přenést do centrifugační zkumavky, buňky usadit centrifugací (1000 g, 3 min, pokojová teplota) a supernatant odstranit. Buňky resuspendovat v 1 ml sterilní vody a převést do mikrozukavky se šroubovacím víčkem.
- Zkumavky s buněčnou suspenzí centrifugovat (30 s, 16 000 g, pokojová teplota) a supernatant důkladně odstranit. Buněčný pelet zamrazit v tekutém dusíku a skladovat při -75 °C.
- Před izolací buněčný pelet rozmrazit a poté přenést na led. Všechny další kroky také provádět na ledu. Přidat 400 µl extrakčního pufru, 400 µl skleněných kuliček a 400 µl směsi kyselého fenolu (Sigma, P-4682):chloroformu:isoamylalkoholu 25:24:1.
- Buňky rozbít pomocí přístroje FastPrep®-24 (MP) při rychlosti 6, 3 x 25 s. Mezi jednotlivými cykly vzorky chladit na ledu.
- Centrifugovat 20 000 g, 10 min, 4 °C a horní fázi přepipetovat do nové mikrozukavky.
- Přidat 30 µl 40% octanu draselného (pH 5,5) a 400 µl směsi fenol:chloroform:isoamylalkohol 25:24:1. Důkladně promíchat pomocí vortexu a znovu centrifugovat. Horní fázi přemístit do čisté mikrozukavky. Pokud ve vzorcích byla stále patrná mezifáze, extrakci opakovat.
- Přidat 1 ml 96% EtOH, zamíchat překlápěním zkumavky, umístit do -20 °C a RNA nechat srážet alespoň 1 hodinu.
- Vysráženou RNA usadit centrifugací (20 000 g, 10 min, 4 °C), supernatant odstranit.

- Sediment opláchnout 500 μ l 70% ethanolem, krátce centrifugovat a supernatant odstranit.
- Usušený pelet rozpustit do 100 μ l vody a změřit její koncentraci pomocí přístroje Nanodrop (Thermo Scientific).
- Odebrat takové množství, které odpovídá 150 μ g RNA a přidat vodu do celkového objemu 175 μ l.
- Dále přidat 20 μ l 10x DNase Buffer a 5 μ l RNase-Free DNase I (1 U/ μ l) z kitu *MasterPureTM Yeast RNA Purification Kit* od firmy Epicentre Biotechnologies.
- DNázování a následnou purifikaci RNA provést podle protokolu kitu (viz výše, začít krokem inkubace ve 37 °C po dobu 30 min).
- Po opláchnutí 70% EtOH k peletu připipetovat 1 ml 70% ethanolem, vzorky takto skladovat při -20 °C a následně odeslat na sekvenční analýzu.

4.2.18. Reverzní transkripce

Je potřeba dodržovat zásady práce s RNA, veškerý plast sterilizovat 3x v autoklávu, vodu ošetřit pomocí DEPC (Sigma; 1 ml na 1 l vody, inkubovat přes noc, DEPC inaktivovat sterilizací v autoklávu).

- Ve zkumavce smíchat 2 μ g celkové RNA, 1 μ l primeru - náhodných hexanukleotidů (ve výsledku 0,02 μ M) a doplnit vodou zbavenou RNáz na celkový objem 12,5 μ l.
- Směs inkubovat 5 min při 65 °C.
- Po skončení inkubace nechat vychladnout na ledu a přidat 4 μ l 5x Reakčního pufru pro RT (Thermo Scientific), 2 μ l dNTP (koncentrace zásobního roztoku 10mM každého nukleotidu, Thermo Scientific), 0,5 μ l RiboLockTM RNase Inhibitor (zásobní roztok 40 u/ μ l, Thermo Scientific) a 1 μ l RevertAidTM Reverse Transcriptase (200 u/ μ l, Thermo Scientific).
- Směs důkladně promíchat a krátce usadit centrifugací. Inkubovat 5 min při pokojové teplotě. Následně přenést do bločku vyhřátého na 42 °C a inkubovat 60 min.
- Reakci zastavit zahřátím na 70 °C po dobu 10 min. Vzniklou cDNA krátkodobě skladovat při -20 °C, dlouhodobě při -75 °C.

4.2.19. Izolace DNA polymeráz

Podle (Desai & Pfaffle 1995).

- Bakteriální kmeny *E. coli* s plazmidy exprimující DNA polymerázu Taq nebo Pfu-X7 ráno zaočkovat do 10 ml média LB s ampicilinem, respektive do 10 ml LB média s ampicilinem a chloramfenikolem (výsledná koncentrace 10 μ g/ml kultury). Kultivovat na třepačce při 37 °C, 180 rpm.

- Večer tuto kulturu přidat k 90 ml příslušného média, přidat IPTG na finální koncentraci 0,5 mM a kultivovat přes noc.
- Ráno kulturu přenést na led a nechat 10 minut chladit.
- Kulturu přelít do 250ml centrifugačních zkumavek (Nalgene), buňky usadit centrifugací (4000 g, 15 min, 4 °C) a supernatant odstranit.
- Buněčný pelet promýt 40 ml vychlazené sterilní deionizované vody, opět centrifugovat a supernatant odstranit.
- Buňky resuspendovat do 3 ml roztoku I (na izolaci plazmidů, složení viz výše), suspenzi přenést do 50ml centrifugační zkumavky a přidat lysozym na výslednou koncentraci 4 mg/ml. Inkubovat 15 minut při 37 °C.
- Pufr A předeřhát na 75 °C, 3 ml přidat k buněčné suspenzi a inkubovat 60 min při 75 °C za stálého míchání.
- Po skončení inkubace nechat vychladnout a centrifugovat v úhlovém rotoru (14 000 g, 10 min, 4 °C).
- Supernatant přenést do čisté 50ml centrifugační zkumavky. Za stálého míchání přidat stejný objem (~ 6 ml) pufru B a následně ~ 6 ml pufru C.
- Takto připravený roztok DNA polymerázy rovnou používat do PCR. Skladovat při -20 °C.
- Účinnost izolovaného enzymu zjistit pomocí PCR s různým množstvím DNA polymerázy a následnou elektroforetickou analýzou produktů.

Pufr A: 30 mM Tris-HCl, pH 8
 1 mM EDTA
 0,25% Tween-20
 0,25% Igepal

4x koncentrovaný základ pro pufr B a C: 200 mM Tris-HCl, pH 8
 400 mM NaCl
 0,4 mM EDTA
 2 mM DTT
 4% Triton-X100

Pufr B: ¼ požadovaného objemu 4x základu pro pufr B a C
 ¼ požadovaného objemu vody
 ½ požadovaného objemu 100% glycerolu (výsledná koncentrace 50%)

Pufr C: ¼ požadovaného objemu 4x základu pro pufr B a C
 ¾ požadovaného objemu 100% glycerolu (výsledná koncentrace 75%)

4.2.20. Amplifikace DNA pomocí PCR

Reakce je vhodné připravovat na ledu a v rukavicích, aby se zabránilo případným kontaminacím.

- V mikrozkušavce o objemu 0,2 - 0,5 ml smíchat reagenty v uvedeném pořadí. Celkový objem reakce je obvykle 10 - 100 μ l:

| Reagenty a zásobní koncentrace | Podíl na celkovém objemu | Výsledná koncentrace |
|--|--------------------------|-------------------------------------|
| deionizovaná voda | x | - |
| 10 x polymerázový pufr | 1/10 | 1x |
| MgCl ₂ (25 mM, Thermo Scientific, polymeráza Taq) MgSO ₄ (25 mM, polymeráza Pfu-X7) | 1/10 | 1,5 - 2,5 mM dle požadavku aplikace |
| dNTP (každý 2,5 mM, Thermo Scientific) | 1/10 | 250 μ M |
| primer 1 (10 μ M) | 1/10 | 1 μ M |
| primer 2 (10 μ M) | 1/10 | 1 μ M |
| templátová DNA | ~ 100 ng | - |

- K reakční směsi přidat DNA polymerázu (typicky 1/200 - 1/10 objemu reakce, podle zjištěné účinnosti nebo podle doporučení výrobce).
- Inkubovat v cykléru pro PCR (Peltier PTC-200, MJ Research, nebo TAdvanced, Biometra) podle příslušného programu.
- Produkty PCR analyzovat pomocí gelové elektroforézy.

10x pufr pro polymerázu Taq: 750 mM Tris-HCl, pH 8,8
200 mM (NH₄)₂SO₄
0,1% Tween-20
20 mM MgCl₂

10x pufr pro polymerázu Pfu-X7: 200 mM Tris-HCl pH 8,8
100 mM KCl
100 mM (NH₄)₂SO₄
1 % Triton X-100
1 mg/ml nuclease-free BSA

4.2.21. Elektroforetická analýza DNA v agarózovém gelu

4.2.21.1. TAE gely

- K 1x koncentrovanému pufru TAE o objemu odpovídajícímu polovině požadovaného objemu gelu přidat příslušné množství agarózy (SeaKem® LE Agarose, Lonza). Množství se řídí podle požadované výsledné koncentrace gelu, která se pohybuje v rozmezí 0,8 - 2,5% v závislosti na délce dělených fragmentů DNA. Suspenzi zvážit.
- Suspenzi vařit v mikrovlnné troubě, dokud se agaróza nerozpustí. Destilovanou vodou doplnit na původní hmotnost.
- Přidat druhou polovinu objemu 1x koncentrovaného pufru TAE, zamíchat a ihned nalévat do aparatury pro přípravu gelů.
- Do jamek nanášet vzorky smíchané se vzorkovým pufrům a také 3 - 10 μ l standardu velikosti fragmentů.
- Vzorky dělit při napětí 4 - 5 V/cm vzdálenosti mezi elektrodami v 1x koncentrovaném pufru TAE.
- Gel barvit ponořením do roztoku ethidium bromidu (0,5 μ g/ml) po dobu 15 - 20 min, poté opláchnout v destilované vodě a rozdělené fragmenty DNA vizualizovat pomocí UV záření. Fotografovat pomocí fotoaparátu Panasonic DMC-FZ7 s červeným/UV filtrem v procházejícím UV záření. Exponovat 1 - 8 s.

50x pufr TAE: 2 M Tris

1 M kyselina octová

100 mM EDTA

pH upravit na 8,5 kyselinou octovou

6x vzorkový pufr: 10 mM Tris-HCl, pH 7,6

60% glycerol

60 mM EDTA

0,15% Orange G

0,03% Xylene cyanol FF

4.2.21.2. SB gely

- K 1x koncentrovanému pufru SB o objemu odpovídajícímu polovině požadovaného objemu gelu přidat příslušné množství agarózy (SeaKem® LE Agarose, Lonza). Množství se řídí podle požadované výsledné koncentrace gelu, která se pohybuje v rozmezí 0,8 - 2,5% v závislosti na délce dělených fragmentů DNA. Suspenzi zvážit.
- Suspenzi vařit v mikrovlnné troubě, dokud se agaróza nerozpustí. Destilovanou vodou doplnit na původní hmotnost.
- Přidat druhou polovinu objemu 1x koncentrovaného pufru SB, zamíchat a ihned nalévat do aparatury pro přípravu gelů.

- Do jamek nanášet vzorky smíchané se vzorkovým pufrem (složení viz TAE gely) a dále 3 - 10 μ l standardu velikosti fragmentů.
- Vzorky dělit při napětí 11 - 12 V/cm vzdálenosti mezi elektrodami v 1x koncentrovaném pufru SB.
- Gel barvit ponořením na 15 - 20 min do roztoku ethidium bromidu (0,5 μ g/ml), poté opláchnout v destilované vodě a rozdělené fragmenty DNA vizualizovat pomocí UV záření. Fotografovat pomocí fotoaparátu Panasonic DMC-FZ7 s červeným/UV filtrem v procházejícím UV záření. Exponovat 1 - 8 s.

20x pufr SB: 200 mM NaOH

takové množství kyseliny borité, aby pH bylo 8,5

4.2.22. Přechišťení DNA pomocí NucleoSpin® Extract II (Macherey-Nagel)

4.2.22.1. Extrakce DNA z agarózového gelu a její přechišťení

- Vyříznout fragment agarózového gelu s požadovanou DNA, přenést ho do předem zvážené 2ml mikrozkušavky, mikrozkušavku znovu zvážit a odečíst hmotnost fragmentu.
- Na 100 mg agarózového fragmentu přidat 200 μ l pufru NTI. Zkušavky inkubovat 5 - 10 min při 50 °C a stálém míchání v třepacím bločku (Thermomixer Comfort, Eppendorf, 1000 rpm), dokud se gel kompletně nerozpustí.
- Kolonku s křemičitou membránou umístit do sběrné zkušavky, na kolonku nanést vzorek (~ 700 μ l) a centrifugovat (30 s, 11 000 g, pokojová teplota). Sběrnou zkušavku vyprázdnit. Pokud ještě zbývá nějaký vzorek, postup opakovat.
- DNA navázanou na membráně na kolonce opláchnout 700 μ l pufru NT3, centrifugovat, sběrnou zkušavku vyprázdnit. Promytí pufrem NT3 lze ještě jednou zopakovat.
- Vysušit membránu centrifugací (1 min, 11 000 g, pokojová teplota).
- Kolonku umístit do čisté 1,5ml mikrozkušavky, přidat 15 - 30 μ l pufru NE, inkubovat 1 min při pokojové teplotě a centrifugovat (1 min, 11 000 g, pokojová teplota). Pro zvýšení výtěžku lze eluční krok ještě jednou zopakovat.

4.2.22.2. Přechišťení DNA v roztoku

- Pokud je celkový objem roztoku DNA menší než 30 μ l, přidat vodu na celkový objem 50 - 100 μ l. Na jeden objem vzorku přidat 2 objemy pufru NTI.
- Kolonku s křemičitou membránou umístit do sběrné zkušavky, na kolonku nanést vzorek (~ 700 μ l) a centrifugovat (30 s, 11 000 g, pokojová teplota). Sběrnou zkušavku vyprázdnit. Pokud ještě zbývá nějaký vzorek, postup opakovat.

- DNA navázanou na membráně na kolonce opláchnout 700 μ l pufru NT3, centrifugovat, sběrnou zkumavku vyprázdnit. Promytí pufrem NT3 lze ještě jednou zopakovat.
- Vysušit membránu centrifugací (1 min, 11 000 g, pokojová teplota).
- Kolonku umístit do čisté 1,5ml mikrozukavky, přidat 15 - 30 μ l pufru NE, inkubovat 1 min při pokojové teplotě a centrifugovat (1 min, 11 000 g, pokojová teplota). Pro zvýšení výtěžku lze eluční krok ještě jednou zopakovat.

4.2.23. Štěpení DNA restrikčními endonukleázami

- Do mikrozukavky napipetovat 2 μ l příslušného 10x koncentrovaného restrikčního pufru, roztok DNA a sterilní deionizovanou vodou doplnit do objemu 20 μ l.
- Přidat 1 - 10 U restrikčního enzymu, zamíchat pipetou a případné kapky na stěnách usadit centrifugací.
- Inkubovat minimálně 1 hodinu při optimální teplotě pro daný enzym (nejčastěji při 37 °C).
- Štěpení zastavit zahřátím (podle specifikace daného enzymu), zamražením do -20 °C nebo přidáním vzorkového pufru.
- Množství a kvalitu naštěpené DNA ověřit pomocí elektroforézy v agarózovém gelu.

4.2.24. Kvantitativní PCR (qPCR)

Reakce je vhodné připravovat na ledu a v rukavicích, aby se zabránilo případným kontaminacím.

- V 1,5ml zkumavce připravit směs sestávající z komerční směsi na qPCR a primerů. V průběhu experimentování byly postupně používány dvě komerční směsi.

Směs na jednu reakci obsahuje:

5 μ l MESA GREEN qPCR MasterMix Plus for SYBR® Assay NO ROX
 0,3 μ l primeru 1 (zásobní koncentrace 10 μ M)
 0,3 μ l primeru 2 (zásobní koncentrace 10 μ M)
 2,9 μ l sterilní deionizované vody

nebo

2 μ l 5x HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Supermix
 0,3 μ l primeru 1 (zásobní koncentrace 10 μ M)
 0,3 μ l primeru 2 (zásobní koncentrace 10 μ M)
 5,9 μ l sterilní deionizované vody

- Směs pomocí dávkovače Eppendorf Xplorer® rozpipetovat po 8,5 µl do jamek 384-jamkové destičky.
- Pomocí dávkovače Concept (Gilson) přidat ke směsi v jamkách 1,5 µl roztoku templátové DNA. Každý vzorek měřit v triplicátu.
- Destičku zalepit fólií, reagencie promíchat pomocí vortexu a usadit centrifugací (1500 g, 1 min).
- Destičku vložit do přístroje LightCycler® 480 Instrument II (Roche Applied Science) a vzorky inkubovat dle programu:

1. preinkubace: 95 °C, 5 min

2. amplifikace (40 cyklů): 95 °C, 15 s

60 °C, 30 s

72 °C, 20 s, na konci tohoto kroku odečíst fluorescenci

3. analýza táním: 95 °C, 5 min

50 °C, 1 min

zvyšovat teplotu o 1 °C za 1 min, průběžně odečítat fluorescenci

- Primární analýzu dat provést s využitím LightCycler® 480 Software Version 1.5.1 (Roche Applied Science).

4.2.25. Chromatinová imunoprecipitace

4.2.25.1. Kultivace buněk

- Ráno buňky zaočkovat do 5 ml příslušného média, kultivovat přes den při 30 °C, 180 rpm.
- Večer kulturu přeočkovat do 50 ml příslušného média na OD ~ 0.002. Kultivovat na třepačce do dosažení OD ~ 1,8 - 2,2 (10 generací, u divokého kmene 15 - 16 hodin).

4.2.25.2. Fixace

- Do narostlých kultur přidat 1,35 ml formaldehydu (výsledná koncentrace 1%). Inkubovat 30 min při pokojové teplotě na orbitální třepačce.
- Fixaci ukončit přidavkem 2,5 ml 2,5M glycinu (výsledná koncentrace 0,125 M), inkubovat 10 min na orbitální třepačce při pokojové teplotě.
- Kulturu přelít do 50ml centrifugačních zkumavek a centrifugovat (1000 g, 3 min, pokojová teplota). Supernatant odstranit.
- Pelet propláchnout resuspendováním ve 40 ml vody a znovu centrifugovat. Supernatant odstranit.
- Pelet resuspendovat v 1 ml vody, převést do 2ml mikrozkušavek, znovu krátce centrifugovat (16 000 g, 30 s, pokojová teplota), supernatant odstranit a pelet zamrazit v -75 °C.

4.2.25.3. *Desintegrace buněk*

Od tohoto kroku je nutné vzorky maximálně chladit, nejlépe v ledové lázni.

- Buněčný pelet nechat rozmrazit, přenést na led a připipetovat k němu 270 μ l vychlazeného pufru LB s inhibitory proteáz (Protease Inhibitors Mix FY, Serva). Převést do zkumavky se šroubovacím víčkem, která obsahuje 800 - 900 mg skleněných kuliček mytých v kyselině.
- Buňky desintegrovat pomocí přístroje FastPrep®-24 (MP). Třepat při rychlosti 5,5, celkem 13 sekund. Opakovat 3x, mezi každým cyklem vzorky chladit 5 min v ledové lázni.
- Rozžhavenou jehlou o průměru 0,45 mm propíchnout dno a víčko zkumavky se vzorky, umístit ji do 1,5ml mikrozkušavky a celý sendvič vložit do 50ml centrifugační zkumavky.
- Centrifugovat (800 g, 2 min, 4 °C) a usazený materiál přepipetovat do čisté 1,5ml mikrozkušavky. Ke kuličkám přidat 100 μ l pufru LB s inhibitory proteáz a centrifugaci opakovat. Usazenou frakci spojit s předchozí.
- Buněčný lyzát centrifugovat (20 000 g, 10 min, 4 °C) a supernatant odstranit.
- Pelet důkladně resuspendovat v 600 μ l pufru LB s inhibitory proteáz a opět centrifugovat (20 000 g, 10 min, 4 °C), supernatant odstranit.
- Pelet resuspendovat ve 270 μ l pufru LB s inhibitory proteáz. Tímto je vzorek připravený k sonikaci.

4.2.25.4. *Sonikace*

- Vzorky umístit do sonikačního přístroje (BioRuptor, Diagenode) se sonikační lázní vychlazenou na 2 °C. Sonikovat při nastavení "high" v režimu 15 s "on", 15 s "off", celkem 15 cyklů.
- Vzorek po sonikaci centrifugovat (24 000 g, 20 min, 4 °C). Supernatant odebrat do čisté 1,5ml mikrozkušavky.

4.2.25.5. *Blokace sefarázy s proteinem A*

- Do čisté mikrozkušavky napipetovat 15 - 20 μ l (nebo pro vlastní imunoprecipitaci 40 - 50 μ l) sefarázy s navázaným proteinem A (nProtein A Sepharose™ 4 Fast Flow, GE Healthcare). Resuspendovat v 500 μ l pufru LB s 0,5 mg/ml BSA a centrifugovat (5 500 g, 2 min, pokojová teplota), supernatant odstranit s využitím Omnican® 100 (B|Braun; "inzulínka", průměr 0,3 mm).
- Sefarázu s proteinem A resuspendovat v 500 μ l pufru LB s 0,5 mg/ml BSA, inkubovat v třepacím bločku (Thermomixer Comfort, Eppendorf) při 1000 rpm po dobu 30 min při pokojové teplotě, poté centrifugovat (viz výše) a supernatant odstranit.
- Sefarázu s proteinem A znovu resuspendovat v 500 μ l pufru LB s 0,5 mg/ml BSA, inkubovat na třepačce (Thermomixer Comfort, Eppendorf) při 1000 rpm po dobu

30 min při pokojové teplotě, poté centrifugovat (viz výše) a supernatant odstranit. Tím je sefaróza s proteinem A připravena k dalšímu použití.

4.2.25.6. *Přečištění lyzátu*

V tomto kroku jde o odstranění těch složek lyzátu, které by se na sefarózu s proteinem A vázaly i za nepřítomnosti protilátky a vytvářely by tak nechtěné pozadí.

- Lyzát po sonikaci (280 μ l) přidat k zablokované sefaróze s proteinem A (původní objem 15 - 20 μ l).
- Inkubovat 1 hodinu v chladové místnosti za stálého míchání (na kolotoči).
- Vzorky poté centrifugovat (5 500 g, 2 min, 4 °C) a supernatant odebrat do čisté 1,5ml mikrozkušavky. Takto připravený vzorek lze skladovat při -75 °C několik dnů.

4.2.25.7. *Preinkubace s protilátkou a inkubace s protilátkou a sefarózou s proteinem A*

- Přečištěný lyzát rozmrazit a odebrat 10 μ l jako “input”. Tento vzorek zatím skladovat při -20 °C.
- Ze zbytku lyzátu odebrat 240 μ l do čisté 1,5ml mikrozkušavky, přidat příslušné množství protilátky (10 μ l HA.11, Covance nebo 10 μ l Pol II Rpb3 1Y26(1Y27), Santa Cruz) a inkubovat 1 hodinu v chladové místnosti za stálého míchání (na kolotoči).
- Lyzát s protilátkou přidat k zablokované sefaróze s proteinem A (původní objem 40 - 50 μ l) a inkubovat v chladové místnosti za stálého míchání (na kolotoči) 3 hodiny.

4.2.25.8. *Promývání, “decrosslink”, izolace DNA*

- Po skončení inkubace vzorky centrifugovat (5 500 g, 2 min, 4 °C) a supernatant odstranit.
- Sefarózovou matici 6x promýt 700 μ l vychlazeného pufru IP, centrifugovat vždy při 5 500 g, 2 min, 4 °C.
- Po posledním proplachu odstranit supernatant a k sefarózové matici s proteinem A a navázaným imunokomplexem přidat 100 μ l 10% roztoku Chelexu (Chelex® 100 Resin, Bio-Rad). 100 μ l tohoto roztoku Chelexu přidat také k rozmraženým vzorkům “input”.
- Vzorky zamíchat pomocí vortexu a inkubovat 10 min při 95 °C.
- Vzorky nechat trochu vychladnout a přidat 1 μ l proteázy K (20 mg/ml), inkubovat 30 min při 55 °C za stálého míchání (1000 rpm, Thermomixer Comfort, Eppendorf). Proteázu K poté inaktivovat inkubací při 95 °C po dobu 10 min.
- Vzorky poté centrifugovat (5 500 g, 2 min, pokojová teplota) a horních 80 μ l supernatantu přepipetovat do čisté 1,5ml mikrozkušavky.

- Ke vzorkům s Chelexem přidat 60 µl sterilní deionizované vody, promíchat 10 s pomocí vortexu a opět centrifugovat. Horních 60 µl supernatantu spojit s předchozími 80 µl.
- Koncentraci takto připravených vzorků změřit pomocí přístroje Nanodrop (Thermo Scientific), příslušně naředit a analyzovat pomocí qPCR.

Pufr LB: 50 mM HEPES, pH 7,6

1 mM EDTA

150 mM NaCl

1% Triton X-100

0,1% deoxycholát sodný (Na-DOC)

Pufr IP: 50 mM Tris-HCl, pH 7,5

1% Triton X-100

150 mM NaCl

5 mM EDTA

0,5% Nonidet NP-40

5. Výsledky

5.1. Prp45 a sestřih pre-mRNA

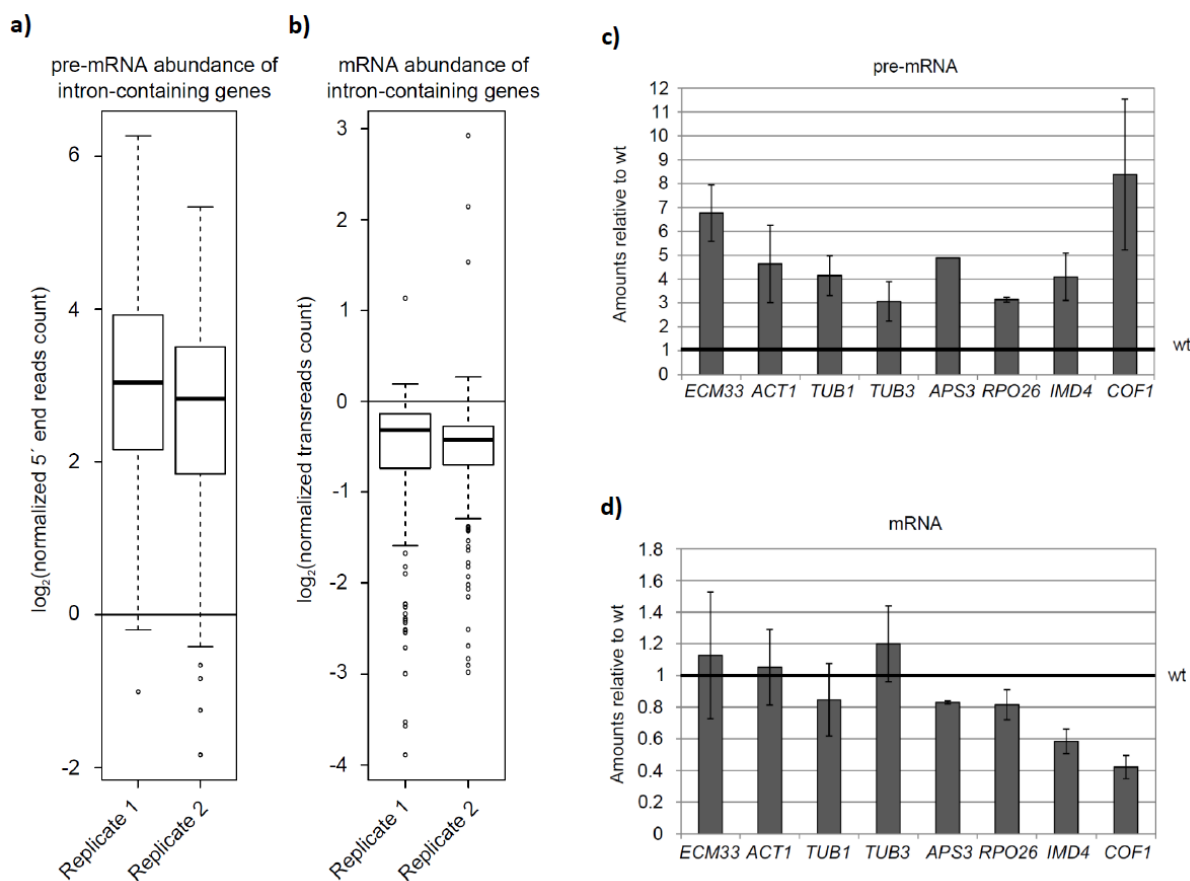
5.1.1. Buňky *prp45*(1-169) akumulují pre-mRNA

Pro zjištění toho, jak mutace *prp45*(1-169) ovlivňuje sestřih pre-mRNA (a také pro zjištění změn v transkripci genů, které neobsahují intron), jsme zvolili celotranskriptomový přístup, metodu RNA-seq. Tato analýza byla dělána ve spolupráci s firmou BGI (Hong Kong). S celkovou RNA izolovanou z divokých buněk a z buněk *prp45*(1-169) kultivovaných při 30 °C ve dvou biologických replikátech firma provedla nabohacení frakce mRNA (“PolyA-enrichment”), přípravu sekvenačních knihoven a vlastní sekvenaci s využitím technologie Illumina. Výsledkem byly 100 nt dlouhé úseky (“ready”) sekvenované z obou konců fragmentů cDNA (“paired-end sequencing”). Pro každý kmen jsme získali > 20 milionů přečtených sekvencí. Kvalita sekvenačních “readů” byla ověřena pomocí fastQC 0.11.4 (www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/). “Ready” byly poté namapovány na genom *S. cerevisiae* r64 pomocí HISAT 2.0.3-beta (Kim et al. 2015). “Ready”, které nebyly namapovány na unikátní místo v genomu (MAPQ < 10), byly odstraněny pomocí SAMtools 1.3.1 (Li et al. 2009). Analýza diferenciální genové exprese byla provedena pomocí R (www.rproject.org/) a nástroje DESeq2 z balíku Bioconductor (Love et al. 2014; Huber et al. 2015). Tato analýza (a identifikace “readů” obsahujících 5’ sestřihové místo a spojení exonů, viz dále) byla provedena dr. M. Převorovským.

Intron-obsahující geny byly detekovány na základě “readů” mapujících do 5’ sestřihového místa, tedy takových, které obsahují první nukleotid intronu. Tyto “ready” byly identifikovány pomocí BEDTools 2.25.0 (Quinlan 2014). Ve dvou biologických pokusech jsme u divokých buněk detekovali 175 a 157 intron obsahujících genů. U buněk *prp45*(1-169) bylo takových genů identifikováno 232 respektive 228. V potaz byly vždy brány jen takové geny, kde byl počet daných “readů” větší nebo roven 5. Z výsledků vyplynulo, že u buněk *prp45*(1-169) dochází k nárůstu hladiny pre-mRNA (Obr. 9a). Medián čítal 7 - 8 násobné zvýšení hladiny oproti divokým buňkám. mRNA byla detekována na základě “readů” překrývajících spojení exonů (“ready” musejí obsahovat poslední nukleotid exonu X a první nukleotid exonu X+1; tyto “ready” byly odhaleny pomocí regtools 0.2.0 (<https://regtools.readthedocs.io>)). Opět byly brány v potaz jen geny, kde byl počet těchto “readů” větší nebo roven 5. Pokles hladin mRNA u mutovaných buněk byl velmi mírný, medián poklesu byl 0,7 - 0,8x (Obr. 9b).

U vybraných intron obsahujících genů byl nárůst hladiny ověřen také pomocí kvantitativní PCR (qPCR) (Obr. 9c). Toto ověření bylo provedeno ve spolupráci s dr. O. Gahurou. Pro detekci pre-mRNA byly použity primery nasedající na rozhraní exon 1 - intron a do intronu a pro detekci mRNA primery nasedající na spojení exonů a do exonu 2. Asi tří- až osminásobný nárůst hladiny pre-mRNA u mutovaných buněk vůči divokým buňkám se potvrdil. Hladiny mRNA byly u některých genů srovnatelné mezi divokými

a mutovanými buňkami (Obr. 9d), zatímco u některých testovaných genů byla hladina mRNA u mutovaných buněk výrazně nižší, například u genů *IMD4* a *COF1*. Tyto geny se od jiných odlišují jistými zvláštnostmi, které mohou (minimálně zčásti) pozorovaný pokles vysvětlit. Gen *IMD4* ve svém intronu kóduje malý jadérkový gen *snR54* a intron genu *COF1* má neobvykle dlouhou vzdálenost mezi místem větvení a 3' sestřihovým místem. Sestřih těchto genů může proto na Prp45 záviset více než sestřih jiných genů a fenotyp u mutovaných buněk může být tím pádem výraznější.



Obr. 9 U buněk *prp45(1-169)* dochází k akumulaci pre-mRNA, zatímco hladiny mRNA jsou postiženy jen mírně. (a) a (b) Hladiny pre-mRNA respektive mRNA v buňkách *prp45(1-169)* ve srovnání s divokými buňkami získané transkriptomickou analýzou. Zobrazena jsou data ze dvou biologických pokusů ("Replicate 1" a "Replicate 2"). (c) a (d) Hladiny pre-mRNA respektive mRNA vybraných genů v buňkách *prp45(1-169)* ve srovnání s divokými buňkami. Data byla získána metodou qPCR a úsečky znázorňují směrodatné odchylky minimálně tří biologických pokusů. Převzato z (Hálová et al. 2017)

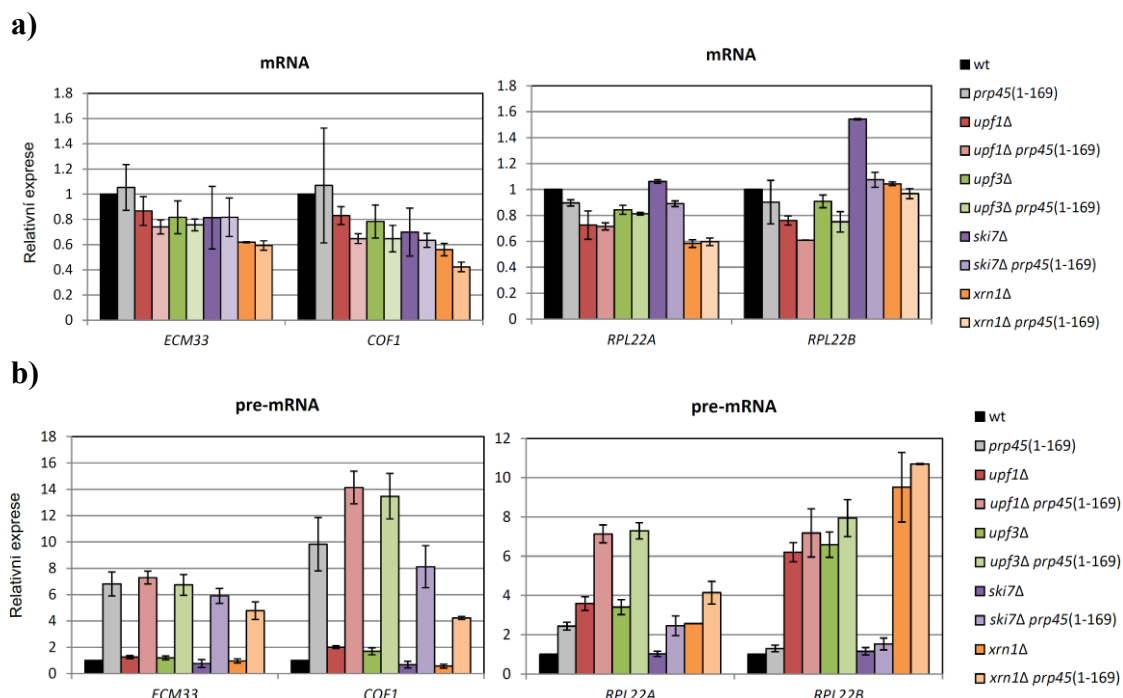
5.1.2. Akumulace pre-mRNA u buněk *prp45(1-169)* není způsobena defektem v degradačních drahách

Akumulace pre-mRNA může být způsobena defektem v sestřihu, nebo také ovlivněním drah, které RNA degradují. Abychom mohli rozlišit mezi těmito dvěma situacemi, rozhodli jsme se pomocí qPCR změřit hladiny pre-mRNA u kmenů s delecemi genů kódujících komponenty různých degradačních drah a u těchto mutantů v kombinaci s mutací *prp45(1-169)* (Obr. 10). Pracovali jsme s kmeny s delecemi komponent dráhy

NMD *UPF1* a *UPF3*, dále s deletantou *SKI7*, jejíž proteinový produkt spojuje degradační komplex Ski s exosomem, a s deletantou cytoplasmatické 5' - 3' exonukleázy *XRNI*.

Pro testování jsme využili čtyři geny: *ECM33*, *COF1*, *RPL22A* a jeho paraloga vzniklého při celogenomové duplikaci *RPL22B*. Výsledky ukázaly, že hladiny mRNA testovaných genů se od hladin v divokém kmeni lišily jen marginálně (Obr. 10a). Nejvíce se hladina mRNA změnila u kmenů *xrn1Δ* a *xrn1Δ prp45(1-169)*, a to tak, že došlo k jejímu poklesu. Tento výsledek byl poněkud překvapivý. Nutno ale poznamenat, že tyto kmeny velmi špatně rostly, takže změřený pokles mRNA může být dán celkovou špatnou kondicí těchto buněk.

Hladiny pre-mRNA (Obr. 10b) nebyly u genu *ECM33* u jednoduchých deletant v genech pro degradační dráhy zvýšeny a akumulace pre-mRNA u dvojitých mutant byla v rozsahu mutanty *prp45(1-169)*. Na rozdíl od genu *ECM33* je degradace pre-mRNA genů *COF1*, *RPL22A* a *RPL22B* závislá na dráze NMD a v případě genů *RPL22A* a *RPL22B* i na cytoplasmatickém exosomu, protože u kmenů s delecemi genů *UPF1*, *UPF3* a *XRNI* (u *RPL22A* a *RPL22B*) došlo k akumulaci jejich pre-mRNA. Tento efekt už byl pozorován dříve (Sayani & Chanfreau 2012). Geny *RPL22A* a *RPL22B* jsou zvláštní tím, že u nich dochází k intergenové regulaci sestřihu (Gabunilas & Chanfreau 2016; Abrahámová et al. 2018). Oba geny kódují ribosomální protein Rpl22. *RPL22A* kóduje majoritní formu Rpl22, zatímco *RPL22B* kóduje minoritní formu. V naší laboratoři a v laboratoři prof. Chanfreaua bylo ukázáno, že proteinový produkt Rpl22 se váže na intron obou paralogů a zabraňuje jejich sestřihu, přičemž gen *RPL22B* je na toto působení mnohem citlivější (Gabunilas & Chanfreau 2016; Abrahámová et al. 2018). Této okolnosti odpovídá i výsledek, že u kmenů s mutací *prp45(1-169)* je pre-mRNA genu *RPL22A* zvýšena asi 2,4x a pre-mRNA genu *RPL22B* pouze 1,3x. Tento gen se totiž ani v divokých buňkách prakticky nesestřihuje, takže akumulace pre-mRNA není u buněk *prp45(1-169)* oproti divokým buňkám výrazná. V případě genů *RPL22A* a *COF1* byly hladiny pre-mRNA u dvojitých mutant *upf1Δ prp45(1-169)* a *upf3Δ prp45(1-169)* vyšší než u jednoduchých mutant zvlášť, v případě genu *RPL22A* tomu tak bylo i v kmeni *xrn1Δ prp45(1-169)*. U těchto genů k sestřihu dochází, proto je nárůst akumulace pre-mRNA výsledkem jak nefungující degradace dané delecí výše zmíněných faktorů, tak defektem v sestřihu způsobeným mutací v *PRP45*. Naproti tomu byla hladina pre-mRNA genu *RPL22B* u výše zmíněných dvojitých mutant stejná jako u jednoduchých deletant genů pro degradační faktory, protože, jak už bylo poznamenáno výše, gen *RPL22B* se prakticky nestřihá a mutace v *PRP45* tedy k akumulaci pre-mRNA nepřispívá. Tato data byla publikována v článku (Abrahámová et al. 2018), kde jsem spoluautorem.



Obr. 10 Akumulace pre-mRNA u buněk *prp45(1-169)* závisí na sestřihu a není způsobena defektem v degradačních drahách. Hladiny mRNA (**a**) a pre-mRNA (**b**) byly měřeny pomocí qPCR. Data byla normalizována na udržovací (“housekeeping”) gen *TOM22*. Úsečky znázorňují směrodatné odchylky minimálně tří biologických měření.

Pozorované výsledky podporují teorii, že akumulace pre-mRNA je způsobena chybou v sestřihu spíše než defektem v degradačních drahách. K podobnému závěru dospěl i pokus provedený v naší laboratoři dr. O. Gahurou. V tomto pokusu byla pomocí qPCR měřena hladina mRNA a pre-mRNA tzv. meiotických genů, které jsou sestřihovány pouze v meióze, kdy je exprimován gen *MER1* (Spingola & Ares 2000). Ve vegetativních buňkách lze sestřih těchto genů navodit ektopickou expresí Mer1 z plazmidu. V nepřítomnosti exprese Mer1 byla hladina pre-mRNA meiotických genů u divokých buněk i u mutant *prp45(1-169)* stejná. V přítomnosti Mer1 došlo k poklesu pre-mRNA jen u divokých buněk, zatímco hladina u mutant byla stále zvýšená (Hálová et al. 2017).

Výsledky získané metodou RNA-seq také neukázaly výrazné změny v expresi genů, které kódují podjednotky degradačních komplexů jako jsou Ski, TRAMP a exosom, komponenty drah NMD a “No-go Decay” a některé další proteiny důležité pro degradaci RNA (Tab. 1). Z 32 testovaných genů byla nejvíce snížena exprese genu *RNT1*, který kóduje jadernou RNÁzu cílící na dvojřetězcovou RNA. Jeho hladina klesla na 73 % hladiny divokých buněk. Další v pořadí, u kterých byla hladina jejich transkriptů snížena na 77 %, byly gen kódující komponentu dráhy “No-go decay” *DOM34* a gen kódující komponentu komplexu TRAMP *AIR1*. Z 32 testovaných genů intron obsahuje jen *UPF2*, který kóduje podjednotku dráhy NMD. Hladina jeho mRNA (měřená pomocí “readů” překrývajících spojení exonů) nebyla u mutantních buněk snížena, ale naopak 1,5x zvýšena.

Tab. 1 Relativní změna exprese genů kódujících komponenty degradačních drah u buněk *prp45(1-169)* ve srovnání s divokými buňkami

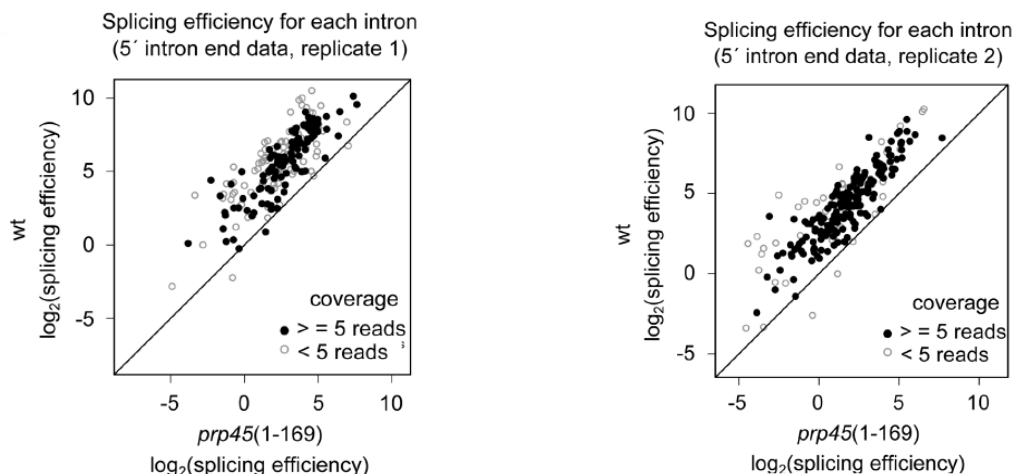
| Systematické jméno | Standardní jméno | Relativní změna exprese (log ₂) <i>prp45(1-169)</i> vs wt | p-value |
|--------------------|------------------|--|----------|
| YMR239C | <i>RNT1</i> | -0.453721697 | 0.015983 |
| YNL001W | <i>DOM34</i> | -0.37867783 | 0.075044 |
| YIL079C | <i>AIR1</i> | -0.368089579 | 0.049045 |
| YJL050W | <i>MTR4</i> | -0.360040602 | 0.008184 |
| YOR001W | <i>RRP6</i> | -0.286861353 | 0.069989 |
| YNL299W | <i>TRF5</i> | -0.282348739 | 0.221065 |
| YNR024W | <i>MPP6</i> | -0.22669588 | 0.555642 |
| YHR077C | <i>NMD2</i> | -0.22324312 | 0.228517 |
| YDR280W | <i>RRP45</i> | -0.219596192 | 0.303393 |
| YHR069C | <i>RRP4</i> | -0.198564444 | 0.393192 |
| YHR081W | <i>LRP1</i> | -0.183329689 | 0.569616 |
| YGR195W | <i>SKI6</i> | -0.178511926 | 0.497451 |
| YGR158C | <i>MTR3</i> | -0.168051879 | 0.518436 |
| YGL246C | <i>RAI1</i> | -0.165734848 | 0.562828 |
| YGR072W | <i>UPF3</i> | -0.160342303 | 0.690125 |
| YCR035C | <i>RRP43</i> | -0.13835739 | 0.642347 |
| YOL021C | <i>DIS3</i> | -0.121635539 | 0.629969 |
| YOL115W | <i>PAP2</i> | -0.109835505 | 0.751976 |

| | | | |
|---------|--------------|--------------|----------|
| YOL142W | <i>RRP40</i> | -0.092049075 | 0.826108 |
| YOR048C | <i>RAT1</i> | -0.091930537 | 0.754822 |
| YNL232W | <i>CSL4</i> | -0.075077272 | 0.876616 |
| YGR095C | <i>RRP46</i> | -0.064037992 | 0.891019 |
| YLR398C | <i>SKI2</i> | -0.060017516 | 0.886727 |
| YPR189W | <i>SKI3</i> | -0.050464155 | 0.906154 |
| YMR080C | <i>NAM7</i> | -0.031691282 | 0.942598 |
| YGR271W | <i>SLH1</i> | -0.018134126 | 0.975026 |
| YDL111C | <i>RRP42</i> | -0.017835161 | 0.972172 |
| YOR076C | <i>SKI7</i> | -0.015460083 | 0.983662 |
| YGL213C | <i>SKI8</i> | -0.004965706 | 0.996909 |
| YDL175C | <i>AIR2</i> | 0.104627652 | 0.844245 |
| YGL173C | <i>XRN1</i> | 0.143927662 | 0.527609 |
| YKR084C | <i>HBS1</i> | 0.154277556 | 0.51542 |

5.1.3. Snížená efektivita sestřihu u buněk *prp45(1-169)* není závislá na kánonicitě 5' sestřihového místa nebo místa větvení

Abychom mohli lépe kvantifikovat, jak mutace *prp45(1-169)* ovlivňuje sestřih, rozhodli jsme se pro každý gen spočítat efektivitu sestřihu a porovnat její hodnotu u divokých a mutovaných buněk. Hodnotu efektivitu sestřihu jsme počítali tak, že jsme počet “readů” pokrývajících spojení exonů vydělili počtem “readů” pokrývajících první (pro výpočet efektivitu sestřihu z dat pro 5' sestřihové místo) nebo poslední (pro výpočet efektivitu sestřihu z dat pro 3' sestřihové místo) nukleotid intronu. Podrobně zpracovaný návod na analýzu primárních dat zahrnujících kontrolu kvality dat, mapování “readů” na genom, identifikaci sestřihových míst a výpočet množství “readů” pokrývajících spojení exon-exon, zjištění počtu “readů” pokrývajících 5' a 3' sestřihová místa a konečný výpočet efektivitu sestřihu jsme publikovali v článku (Převorovský et al. 2016), na kterém

jsem se podílela jako spoluautor. Výsledky potvrdily (Obr. 11), že efektivita sestřihu je u buněk *prp45*(1-169) oproti divokým buňkám snížena.

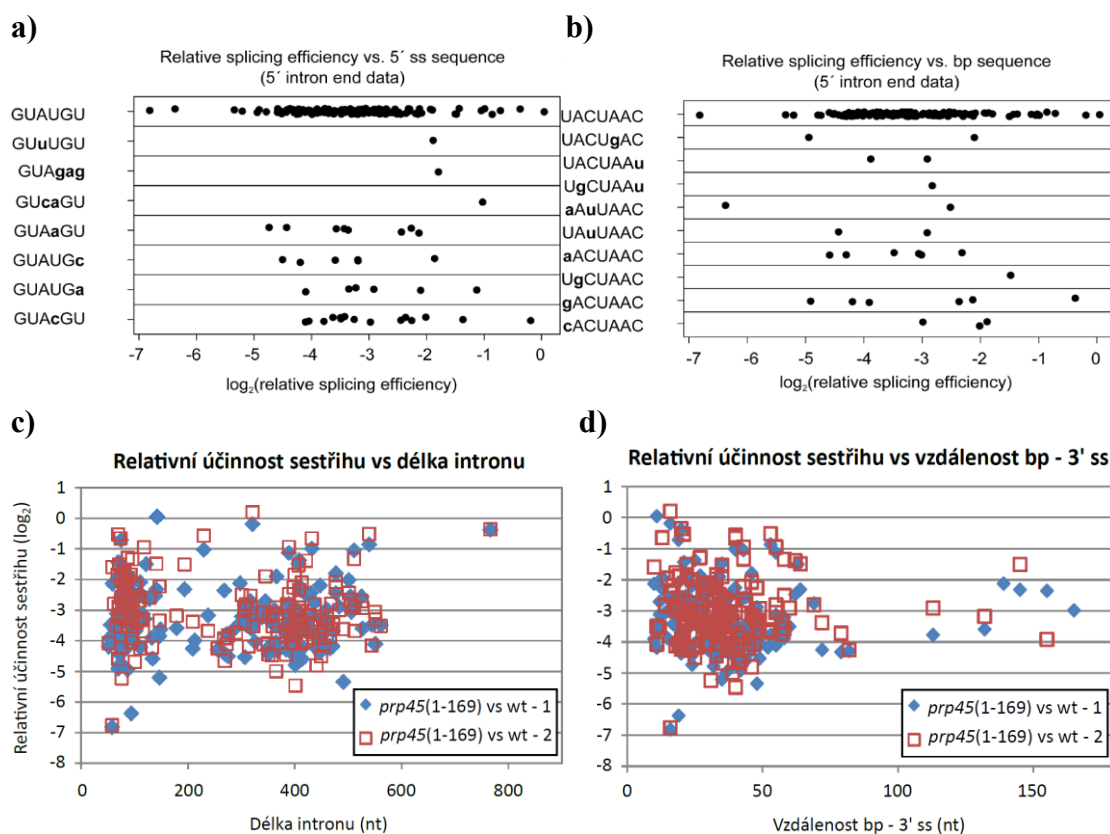


Obr. 11 Efektivita sestřihu je u buněk *prp45*(1-169) snížena. Vlevo a vpravo jsou zobrazeny výsledky pro první respektive druhý biologický pokus. Zobrazeny jsou hodnoty efektivit sestřihu jak pro geny, kde byl počet “readů” pro daný typ RNA nižší než 5 (prázdná kolečka), tak i pro geny s počtem “readů” jednotlivých typů RNA vyšší než 5 (plná kolečka). Převzato z (Hálová et al. 2017).

V naší laboratoři byla v předchozích letech metodou “primer extension” testována efektivita sestřihu rekombinantních reportérových konstruktů (Gahura et al. 2009; Konarska et al. 2006). Metoda “primer extension” je vlastně reverzní transkripce, která probíhá z radioaktivně značeného primeru nasedajícího do oblasti exonu 2, která je společná všem rekombinantním reportérovým konstruktům. Po proběhnutí reakce se pak pomocí polyakrylamidového gelu oddělí jednotlivé produkty cDNA, u kterých lze podle velikosti odečíst, zda pocházejí z mRNA (obvykle nejkratší produkt), pre-mRNA (obvykle nejdelší produkt) nebo ze struktury lariát-exon 2. Reverzní transkriptáza totiž není schopna překonat místo větvení, vzniká proto produkt s rozdílnou velikostí oproti mRNA a pre-mRNA (pro pokus je však nutné použít buňky s delecí genu *DBRI*, který kóduje enzym rozvíjející strukturu lariátu při degradaci vyštěpeného intronu). Densitometrická analýza signálu poté umožňuje výpočet efektivy zvlášť prvního a druhého kroku sestřihu (Liu et al. 2007; Konarska et al. 2006). Reportérové konstrukty obsahují mutace v 5' sestřihovém místě, v místě větvení nebo v 3' sestřihovém místě, které způsobují, že se pro sestřih daného konstruktu stává rychlostně limitující první nebo druhý sestřihový krok. Další mutace, například v sestřihovém faktoru, se pak projeví výrazněji než u konstruktů bez mutací v sestřihových místech, což umožní přesněji rozlišit, zda se zkoumaný sestřihový faktor podílí na regulaci spíše prvního nebo druhého kroku sestřihu.

Výsledky ukázaly, že mutace v oblasti místa větvení u reportérového konstruktů zhoršovaly u buněk *prp45*(1-169) první krok sestřihu, zatímco mutace v oblasti 5' nebo 3' sestřihového místa vedly ke zhoršení druhého sestřihového kroku (mutace v 5' sestřihovém místě GUcUGU vytváří o jednu Watson-Crickovu interakci navíc, což vede k hyperstabilizaci konformace prvního sestřihového kroku, což ovlivňuje průběh druhého

sestřihové reakce (Gahura et al. 2009; Konarska et al. 2006)). Rozhodli jsme se proto otestovat, zda se zhoršená efektivita sestřihu u buněk *prp45(1-169)* neprojevuje zejména u genů s nekánonickými sestřihovými místy. Nejprve jsme se zaměřili na 5' sestřihové místo (Obr. 12a). Geny s introny, které jsme identifikovali v rámci analýzy RNA-seq, jsme rozdělili do osmi skupin podle typu 5' sestřihového místa. Nejvíce genů obsahovala podle předpokladu skupina s kánonickým 5' sestřihovým místem. Dalších sedm skupin obsahujících od jednoho do šestnácti genů se lišilo různými (ale přirozenými) změnami v sekvenci 5' sestřihového místa. Porovnání relativní efektivity sestřihu genů mezi skupinami ukázalo, že se relativní efektivita sestřihu u genů s nekánonickým 5' sestřihovým místem nelišila od relativní efektivity sestřihu genů s kánonickým 5' sestřihovým místem. Dále jsme se zaměřili na místo větvení (Obr. 12b). Různých typů míst větvení včetně kánonického jsme mezi testovanými geny identifikovali deset. Porovnání relativní efektivity sestřihu opět neodhalilo rozdíl mezi geny s kánonickým místem větvení oproti těm s nekánonickým místem větvení. Kromě kánonicity 5' sestřihového místa a místa větvení jsme dále testovali, zda zhoršená efektivita sestřihu u buněk *prp45(1-169)* nezávisí na celkové délce intronu nebo na vzdálenosti mezi místem větvení (Obr. 12c) a 3' sestřihovým místem (Obr. 12d). Výsledky opět ukázaly, že zde taková závislost není.



Obr. 12 Zhoršená efektivita sestřihu u buněk *prp45(1-169)* nesouvisí s kánonicitou 5' sestřihového místa nebo místa větvení, s délkou intronu ani se vzdáleností mezi místem větvení a 3' sestřihovým místem. Geny byly rozděleny do skupin podle typu 5' sestřihového místa (a) nebo místa větvení (b) a byla spočítána jejich relativní efektivita sestřihu. Skupina s kánonickými místy je v grafech umístěna vždy úplně nahoře. Zobrazená data byla spočítána na základě výsledků získaných z prvního

biologického pokusu RNA-seq a jsou srovnatelná s výsledky z druhého biologického pokusu. Grafy (c) a (d) zobrazují závislost relativní efektivity sestřihu na celkové délce intronu respektive na vzdálenosti mezi místem větvení a 3' sestřihovým místem. Zobrazena jsou data pro oba biologické pokusy (červené čtverečky a modré kosodélníky). Relativní efektivita sestřihu byla počítána jako (počet "readů" přes rozhraní exon-exon u mutant / počet "readů" přes 5' sestřihové místo u mutant) / (počet "readů" přes rozhraní exon-exon u divokých buněk / počet "readů" přes 5' sestřihové místo u divokých buněk). Převzato z (Hálová et al. 2017) a nepublikovaná data.

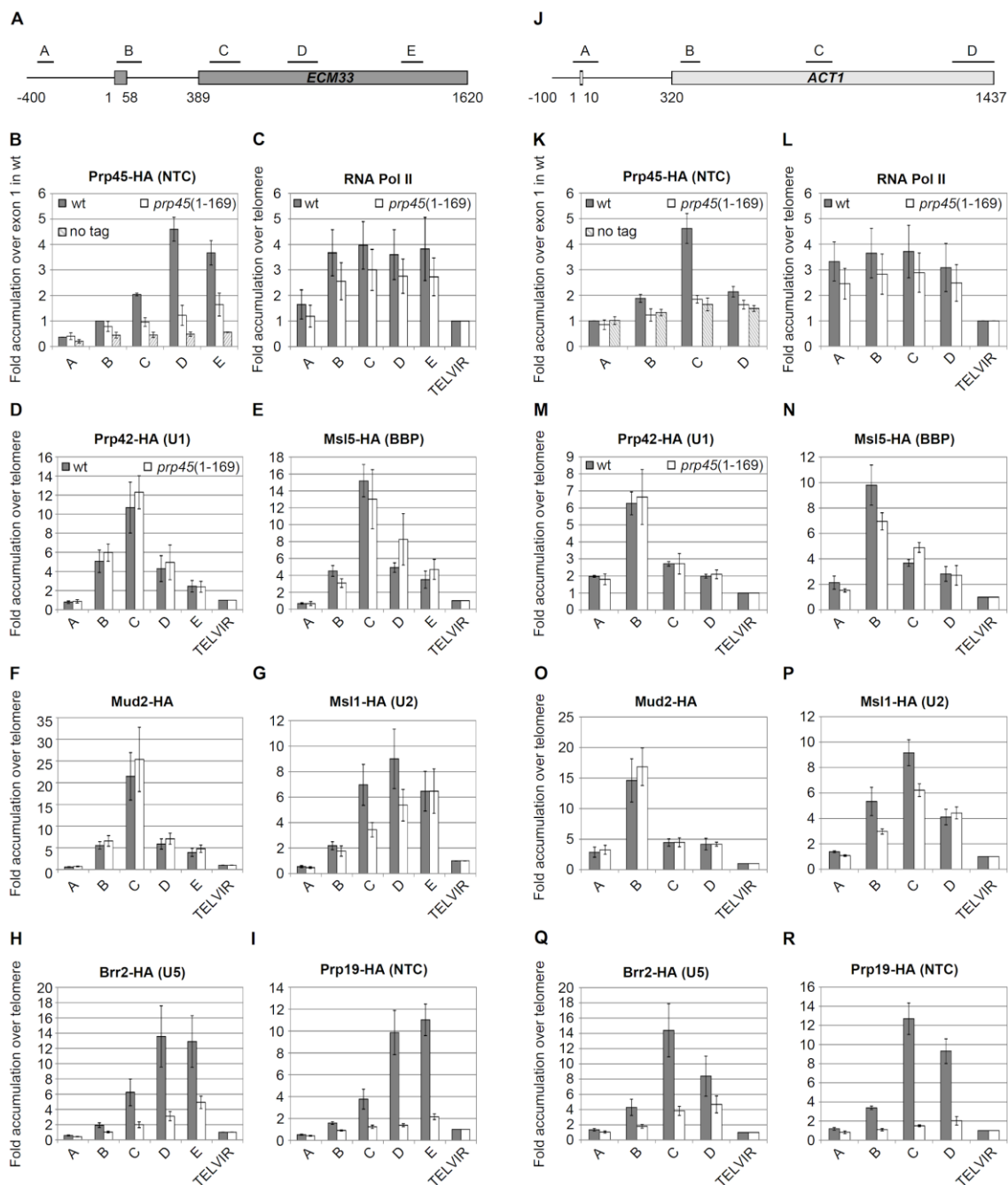
5.1.4. Mutace *prp45(1-169)* způsobuje defekty v kotranskripčním sestavování spliceosomu

Zvýšená akumulace pre-mRNA u buněk *prp45(1-169)* detekovaná pomocí "readů" nebo primerů překrývajících 5' sestřihové místo znamená, že tato mutace ovlivňuje sestřihovou reakci ještě před proběhnutím prvního kroku sestřihu, než v tomto místě dojde k rozrušení vazby mezi exonem 1 a intronem. Abychom zjistili, který krok při formování spliceosomu mutace v *Prp45* ovlivňuje, přistoupili jsme k testování vyvazování jednotlivých spliceosomálních komponent k sestřihovaným genům metodou chromatinové imunoprecipitace (ChIP). ChIP je metoda, pomocí které lze zjistit, zda se konkrétní protein (definovaný protilátkou proti danému proteinu popřípadě proti značce ("tag") na daném proteinu) váže na konkrétní lokus DNA (definovaný primerem). Princip metody spočívá v tom, že se nejprve pomocí formaldehydu kovalentně, ale reverzibilně, prováže DNA s proteiny v její blízkosti ("crosslink"). Následuje desintegrace buněk, izolace chromatinu a jeho fragmentace sonikací na kratší úseky (v našem případě cca 500 bp). Pomocí protilátky je poté imunoprecipitován protein zájmu v komplexu s DNA, na kterou je navázán. Po rozrušení kovalentních vazeb mezi proteinem a DNA je DNA izolována a přítomnost konkrétního úseku zájmu je stanovována pomocí PCR nebo qPCR.

Vazba sestřihových faktorů, kterou jsme se rozhodli studovat my, probíhá na RNA, nikoli na DNA. Avšak vzhledem k tomu, že sestřih (nejen) u *S. cerevisiae* probíhá kotranskripčně a sestřihové faktory se na příslušná místa vážou, jakmile opustí výstupní kanál RNA Pol II, jsou tyto faktory v době vazby na RNA dostatečně blízko DNA, takže s ní mohou být působením formaldehydu provázány a jsou tedy metodou ChIP zachytitelné. Sledování profilu vazby podél testovaných genů s využitím několika párů primerů může být navíc interpretováno jako časová osa, na základě které lze určit pořadí vyvazování a odvazování jednotlivých sestřihových komponent během formování katalyticky aktivního spliceosomu (Kotovic et al. 2003; Görnemann et al. 2005).

Pro analýzu metodou ChIP jsme využili kmeny, ve kterých byly vybrané sestřihové faktory označeny značkou HA. Do těchto kmenů jsme homologní rekombinací nebo metodou *Delitto Perfetto* (Storici & Resnick 2006) zavedli mutaci *prp45(1-169)*. Vyvazování sestřihových faktorů jsme sledovali na dvou intron-obsahujících genech, *ECM33* a *ACT1* (Obr. 13a, j). Oba tyto geny jsou vysoce exprimované a vyznačují se dlouhým exonem 2, který umožňuje detekci vyvazování i takových sestřihových komponent, které se váží v pozdějších fázích sestavování spliceosomu. Jako negativní kontrola sloužil lokus telomery na pravém raménku chromozomu VI (TEL_{VIR}), kam se

sestříhové faktory nevážou. Nejprve jsme testovali vyvazování U1 snRNP reprezentovanou komponentou Prp42 (Obr. 13d, m). U divokých buněk byla nejvyšší hladina tohoto proteinu detekována v 5' oblasti exonu 2 a tento nárůst byl následován prudkým poklesem, což už bylo publikováno dříve (Görnemann et al. 2005). Tento profil odpovídá tomu, že U1 snRNP je navazována jako jedna z prvních komponent při vzniku spliceosomu a během formování katalyticky aktivního spliceosomu (konkrétně ve fázi před vznikem komplexu B^{act}) je zase uvolněna. Profil vazby se však mezi divokými buňkami a buňkami s mutací *prp45*(1-169) nelišil. Dalšími testovanými faktory byly podjednotky komplexu "commitment" Msl5 a Mud2. V divokých buňkách byl profil jejich vyvazování prakticky stejný jako profil vyvazování U1 snRNP, což je v souladu s již publikovanými daty (Görnemann et al. 2005) (Obr. 13e, f, n, o). Co se týká rozdílu mezi divokými buňkami a buňkami s mutací *prp45*(1-169), tak zatímco se profil vyvazování Mud2 u mutant od divokých buněk prakticky nelišil, profil vyvazování proteinu Msl5 byl u mutant divokým buňkám podobný, ale s tendencí lehké akumulace ve střední části exonu 2. Dále byly testovány profily vazby U2 snRNP, U5 snRNP a komplexu NTC reprezentovanými faktory Msl1, Brr2 a Prp19 (Obr. 13g, h, i, p, q, r). U divokých buněk se jejich hladina od 5' konce genů postupně zvyšovala, se strmějším vzestupem hladiny proteinu Msl1, až dosáhla maxima uprostřed exonu 2. Dále se jejich hladina buď mírně snížila, nebo zůstala na stejné úrovni. To je opět v souladu s již publikovanými daty (Görnemann et al. 2005). V profilu vyvazování těchto faktorů se projevily rozdíly mezi divokými buňkami a buňkami s mutací v *PRP45*. Akumulace Msl1 (U2 snRNP) byla oproti divokým buňkám mírně zpožděna. Toto zpoždění se však přenášelo do dalších fází sestavování spliceosomu, kde způsobilo ještě vážnější defekt ve vyvazování Brr2 (U5 snRNP) a vyvazování Prp19 (NTC) už u mutantních buněk nebylo téměř detekovatelné (Obr. 13g, h, i, p, q, r). Kromě výše zmíněných sestříhových faktorů jsme měřili profil vyvazování i samotného Prp45 (Obr. 13b, k). Pro tento účel jsme využili kmeny se značkou HA jak na C-konci zkráceného proteinu Prp45(1-169), tak na C-konci proteinu plné délky. Nejvyšší hladina Prp45 byla pozorována uprostřed exonu 2. Vyvazování mutantního proteinu bylo velmi zhoršeno, stejně jako v případě vyvazování U5 snRNP a komplexu NTC. Abychom ověřili, zda pozorované zpoždění ve vyvazování některých sestříhových faktorů není dáno změnami v transkripci, metodou ChIP jsme měřili také množství RNA Pol II podél testovaných genů (Obr. 13c, l). Výsledky ukázaly, že množství RNA Pol II je u mutovaných buněk celkově mírně sníženo, ale jinak se profil mezi divokými a mutovanými buňkami neliší. Máme za to, že malá změna v množství RNA Pol II u mutovaných buněk není příčinou pozorovaného výrazného defektu v sestavování spliceosomu (Hálová et al. 2017).



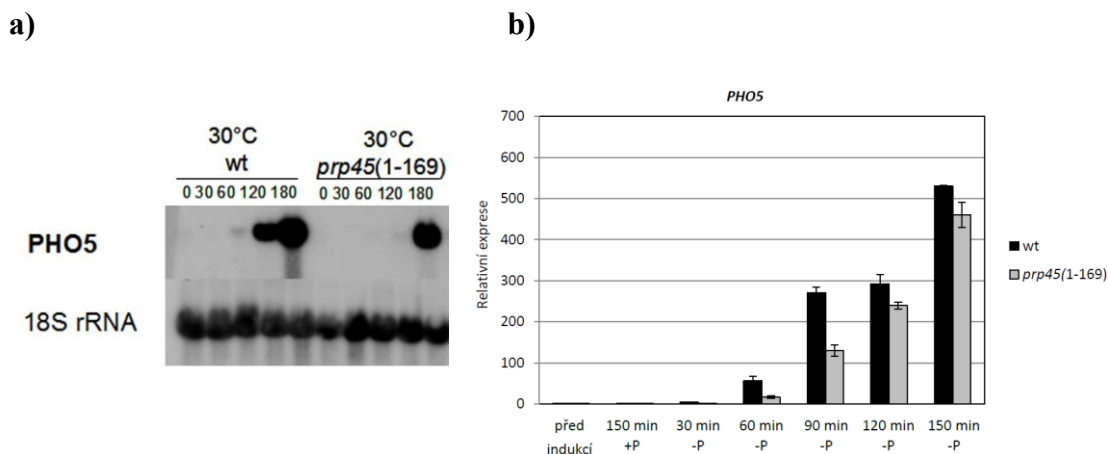
Obr. 13 Mutace *prp45(1-169)* způsobuje defekty v sestavování spliceosomu. (a, j) Schéma genů *ECM33* a *ACT1*. Vodorovnými čárkami jsou znázorněny amplikony použité při analýze ChIP-qPCR. (d) až (r) Profil vyvazování vybraných sestřihových faktorů značených na C-konci značkou HA. ChIP byl proveden pomocí protilátky anti-HA.11 (Covance). Signál byl normalizován na hodnotu naměřenou ve vzorcích “input” a vztážen na oblast telomery na pravém raménku chromosomu VI (TEL VIR), kam se sestřihové faktory nevážou. Úsečky znázorňují směrodatnou odchylku nejméně čtyř biologických pokusů. (b, k) Profil vyvazování Prp45-HA a Prp45(1-169)-HA. Signál byl normalizován na hodnotu naměřenou ve vzorcích “input” a vztážen na hodnotu naměřenou v exonu 1 v kmeni Prp45-HA (lokus B u *ECM33* a lokus A u *ACT1*). Jako negativní kontrola sloužil vzorek bez přidané protilátky. (c) a (l) Profil vyvazování RNA Pol II. ChIP byl proveden pomocí protilátky anti-Rpb3 (Santa Cruz). Signál byl normalizován na hodnotu naměřenou ve vzorcích “input” a vztážen na oblast TEL VIR. Převzato z (Hálová et al. 2017).

5.2. Prp45 a regulace transkripce

5.2.1. Úvod

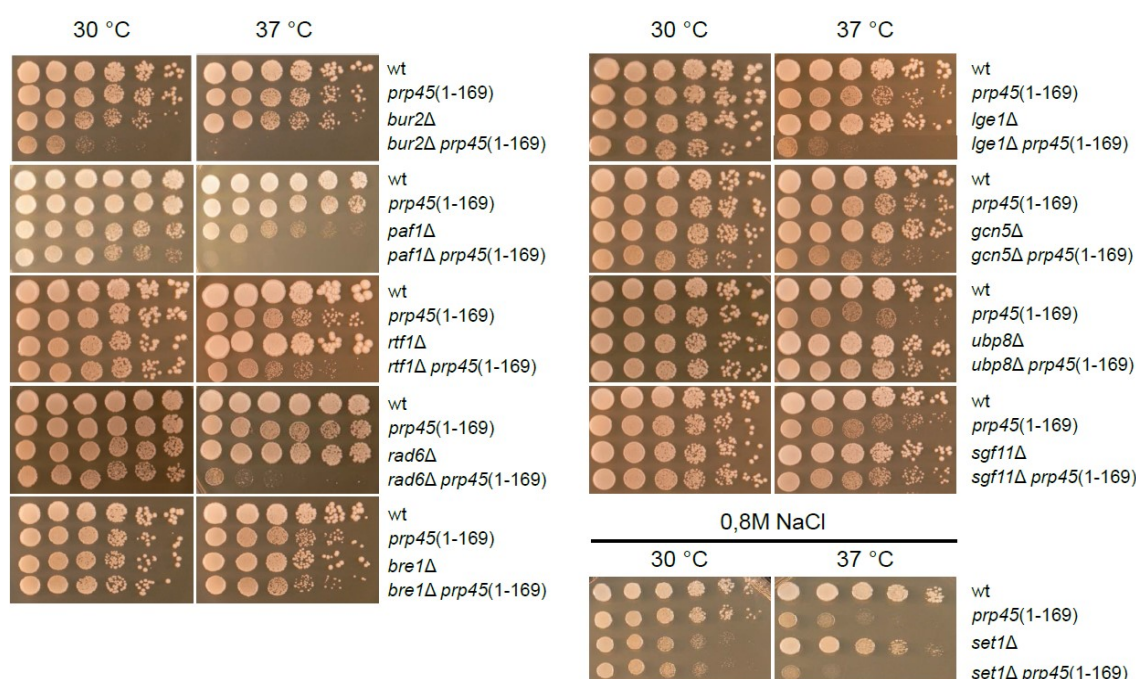
Výsledky mé disertační práce navazují na výsledky, které jsem získala v rámci své diplomové práce, nebo které byly získány v dřívějších letech jinými členy naší laboratoře. V této kapitole bych tyto výsledky, na které navazuji, ráda shrnula.

Poté, co byla v naší laboratoři připravena termosenzitivní alela *prp45*(1-169), snažili jsme se blíže charakterizovat fenotyp buněk nesoucích tuto alelu. Jedním z pokusů byla i analýza transkriptomu metodou “microarrays“ provedená dr. Kateřinou Abrhánovou. Výsledky odhalily změny v transkriptomu mutovaných buněk už při permissivní teplotě 30 °C, a to i u genů neobsahujících intron. Mezi geny, jejichž exprese byla u mutovaných buněk ovlivněna nejvíce, patřily geny kódující proteiny zajišťující příjem, zpracování a ukládání fosfátu, geny dráhy *PHO* (Abrhánová, 2010). Exprese těchto genů je indukovatelná přenosem do média, které neobsahuje fosfát. Výsledky získané metodou “microarrays“ byly dr. Abrhánovou pro tyto geny potvrzeny pomocí metody Northern blot (Abrhánová, 2010) a mnou v rámci mé diplomové práce pomocí qPCR (Hálová, 2011). Obě metody ukázaly, že indukce exprese těchto genů bez intronů je u buněk *prp45*(1-169) zpožděna (Obr. 14). Podobný efekt byl pozorován i v případě jiných genů neobsahujících intron, *GALI* a *GALI0*, které kódují proteiny metabolismu galaktózy (dr. A. Valentová, nepublikované výsledky).



Obr. 14 Indukce genů dráhy *PHO* je u buněk *prp45*(1-169) zpožděna. Tento fenotyp je zobrazen na příkladu genu dráhy *PHO*, *PHO5*. Buňky byly kultivovány v médiu s fosfátem, přeneseny do média bez fosfátu a ve vyznačených časech byla zjišťována hladina exprese genu *PHO5*. **(a)** Analýza metodou Northern blot provedená dr. Abrhánovou (převzato z Abrhánová, 2010). **(b)** Analýza metodou qPCR. Hladina *PHO5* byla měřena před indukcí exprese a vždy po 30 minutách po přenosu do média bez fosfátu (-P). Kontrolní vzorek byl odebrán i z fosfátového média (+P). Expresi byla normalizována na expresi genu *TOM22* a vztažena na hladinu v divokých buňkách ve vzorku před přenesením do média bez fosfátu. Úsečky znázorňují směrodatné odchylky dvou biologických pokusů (Hálová, 2011, upraveno).

V literatuře byla popsána závislost indukce genů *PHO* a *GAL* na některých faktorech regulujících elongaci transkripce a modifikace chromatinu (Carvin & Kladde 2004). Pro prvotní zjišťování souvislosti funkce Prp45 s transkripcí u *S. cerevisiae* jsme proto testovali genetické interakce mezi alelou *prp45(1-169)* a delečními alelami faktorů důležitých pro expresi genů *PHO* a *GAL*. To byl také jeden z cílů mé diplomové práce, na kterém jsem spolupracovala s dr. A. Valentovou. Zjistily jsme, že alela *prp45(1-169)* negativně geneticky interaguje například s delečními alelami genů, které kódují komponenty komplexů fosforylujících CTD RNA Pol II Bur1/Bur2, komponenty elongačního komplexu PAF, enzymy ubiquitiny-lující H2B na lysinu 123 Rad6/Bre1/Lge1 a s deleční alelou genu kódujícího histonacetyltransferázu Gcn5 (viz Literární úvod). Při testování růstu na různých stresorech (např. hydroxymočovina, NaCl nebo 6-azauracil) dochází ke genetické interakci i s deleční alelou genu kódujícího histonmethyltransferázu Set1. Naopak pozitivní genetická interakce byla pozorována s delečními alelami genů *UBP8* a *SGF11*, což jsou podjednotky komplexu SAGA, který zprostředkuje deubiquitiny-laci lysinu 123 histonu H2B (Hálová, 2011, dr. A. Valentová, nepublikované výsledky) (Obr. 15). S řadou jiných delečních alel, jejichž proteinové produkty souvisejí s elongací transkripce nebo s modifikacemi chromatinu, však alela *prp45(1-169)* geneticky neinteragovala.



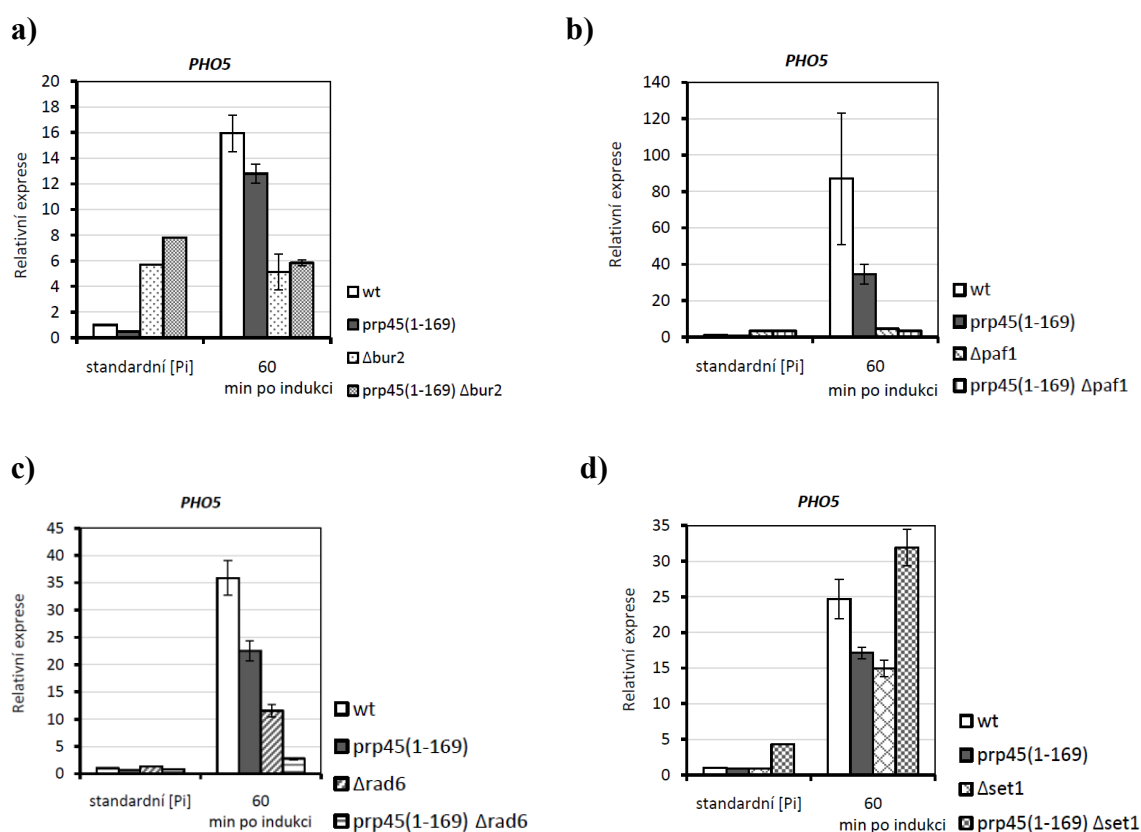
Obr. 15 *prp45(1-169)* geneticky interaguje s delečními alelami genů kódujících regulátory transkripce a modifikátory chromatinu. Kapkový test s ředícím faktorem 5 provedla dr. A. Valentová.

Následně jsem v rámci své diplomové práce testovala, jak delece vybraných klíčových elongačních regulátorů, konkrétně Bur2, Paf1, Rad6 a Set1, sama o sobě a nebo v kombinaci s mutací *prp45(1-169)* ovlivní indukci genů *PHO*. Měření jsem prováděla pouze v jednom časovém bodě po indukci exprese, což nám pro prvotní náhled stačilo. Výsledky experimentů ukázaly, že v 60. minutě po indukci exprese byla hladina *PHO5*

u buněk *bur2Δ* a *paf1Δ* stejná jako v neindukčních podmínkách a dvojitá mutace hladinu *PHO5* v indukčních ani neindukčních podmínkách dále neovlivnila (Obr. 16a, b). Zajímavé bylo také pozorování, že u těchto deletantů byl gen *PHO5* dereprimován, tedy že jeho hladina byla oproti divokým buňkám v neindukčních podmínkách zvýšena. Tento efekt byl už v literatuře pro některé deletanty popsán (Carvin & Kladde 2004), u deletanty *BUR2* to však bylo pozorováno poprvé.

V případě buněk s delecí genu *RAD6* byla hladina *PHO5* v 60. minutě po indukci oproti divokým buňkám i oproti buňkám s mutací *prp45(1-169)* snížena a současná mutace *prp45(1-169)* tento defekt ještě více prohloubila (Obr. 16c). Výsledky jsme interpretovali tak, že zde dochází k syntetické negativní interakci mezi deleční alelou genu *RAD6* a mutací *prp45(1-169)* na úrovni indukce genu *PHO5*.

Co se týká buněk s delecí genu *SET1*, už v médiu se standardní koncentrací fosfátu byla pozorována zvýšená hladina transkriptu *PHO5* u dvojitě mutantů *set1Δ prp45(1-169)*. Nepozorovali jsme však navýšení exprese *PHO5* u jednoduché deletanty *SET1*, což jsme podle literatury očekávali (Carvin & Kladde 2004). V 60. minutě po indukci byla hladina *PHO5* u buněk *set1Δ* stejná jako u buněk *prp45(1-169)* a zvýšená hladina *PHO5* pozorovaná v neindukčních podmínkách u dvojitě mutantů se projevila i po přenosu buněk do indukčních podmínek, jeho hladina byla srovnatelná s divokými buňkami. Tento výsledek by naznačoval, že zde existuje pozitivní genetická interakce mezi *prp45(1-169)* a *set1Δ*.



Obr. 16 Na úrovni indukce genu *PHO5* *prp45(1-169)* interaguje s deleční alelou *RAD6* negativně. Hladina transkriptu genu *PHO5* byla pomocí qPCR měřena v médiu se standardní koncentrací

fosfátu a 60 minut po přenosu do indukčních podmínek. Data byla normalizována na hladinu exprese genu *TOM22* a vztažena k hladině divokých buněk v médiu se standardní koncentrací fosfátu. Úsečky znázorňují směrodatné odchylky tří technických triplikátů qPCR. Převzato a upraveno z Hálková, 2011.

Všechny tyto výsledky nicméně naznačují, že funkce proteinu Prp45 není spojena jen se sestřihem pre-mRNA, ale také s elongací transkripce. Podle našich hypotéz může být toto propojení realizováno například skrze ovlivnění histonových modifikací nebo skrze ovlivnění chromatinové struktury, například změnou mobility nukleosomů. Nelze však vyloučit ani vliv přímo na transkripční faktory a koregulátory elongace transkripce, jak bylo popsáno pro orthology proteinů SNW v jiných organismech. Bližší výzkum tohoto zapojení a také možné regulační spřažení elongace transkripce a sestřihu pre-mRNA skrze protein Prp45 byl cílem mého postgraduálního studia.

5.2.2. Diferenciální interakce na úrovni indukce *PHO5* mezi *prp45(1-169)* a delečními alelami vybraných elongačních faktorů a modifikátorů chromatinu

Abychom mohli blíže charakterizovat vliv dvojitého mutantu na indukci genu *PHO5* testovaných v rámci mé diplomové práce, rozhodli jsme se měřit hladinu genu *PHO5* ve více časových bodech po indukci exprese. Také jsme se rozhodli testovat indukci i v dalších kmenech s delecemi genů kódujících regulátory elongace transkripce a modifikátory chromatinu. Jako první jsme testovali buňky *bur2Δ* a buňky s dvojitou mutací *bur2Δ prp45(1-169)*. Indukci jsme měřili ve 45., 90., 135. a 180. minutě po přenosu buněk do indukčních podmínek. Jak je patrné z obrázku 17a, k indukci genu *PHO5* u buněk *bur2Δ* dochází, i když mnohem pomaleji než v divokých buňkách a také než v buňkách *prp45(1-169)*. U buněk s dvojitou mutací dochází k indukci také (viz výřez vpravo), ale ve studovaném časovém intervalu jen ve velmi malém rozsahu. Nicméně tendence ke genetické interakci mezi *bur2Δ* a *prp45(1-169)* na úrovni indukce genu *PHO5* je patrná, ale pro ověření by bylo nutné měřit množství transkriptu *PHO5* v dalších časových intervalech po indukci exprese. V tomto uspořádání pokusu jsou tedy výsledky nekonkluzivní.

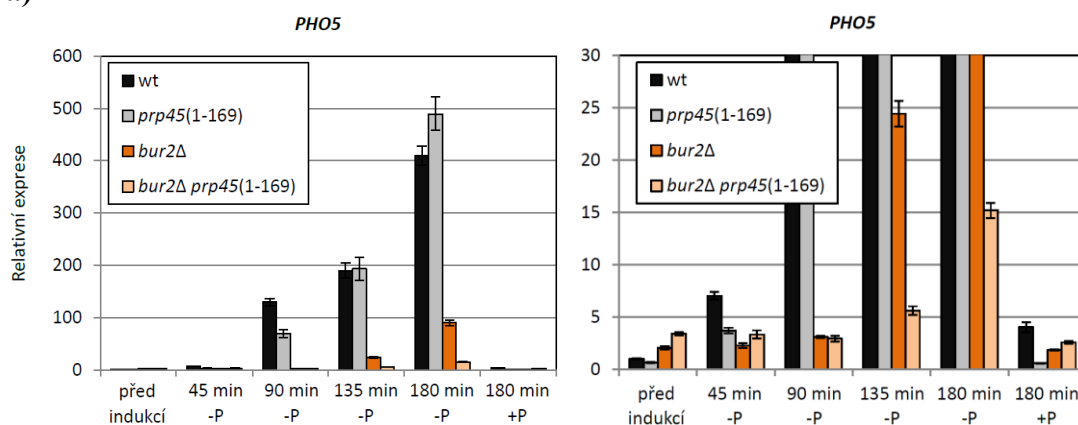
Podobná situace byla pozorována i v případě buněk *paflΔ* a v odpovídající dvojité mutantě (Obr. 17b). U těchto buněk (a také ve všech dalších pokusech tohoto typu) jsme hladinu *PHO5* měřili v 60., 90. a 120. minutě po přenosu do média bez fosfátu. Indukce genu *PHO5* byla velmi zhoršena už u buněk *paflΔ* a současná mutace v *PRP45* způsobila, že se gen *PHO5* v daném časovém intervalu indukoval jen nepatrně. I v tomto případě by tedy pro potvrzení genetické interakce u dvojitého mutantu bylo nutné měřit hladinu *PHO5* v delších časech po indukci. Na rozdíl od předchozích pokusů provedených v rámci mého diplomového projektu jsme derepresi genu *PHO5* v neindukčních podmínkách pozorovali jen u buněk *bur2Δ* (a u odpovídajících dvojitého mutantu), a to v mnohem menším rozsahu. U buněk *paflΔ* se dereprese neprojevila. Možné příčiny této diskrepance budou rozebrány v diskusi (kapitola 6.3.2.).

Poté jsme měřili kinetiku indukce genu *PHO5* u buněk *rad6Δ* a u buněk *rad6Δ prp45(1-169)* (Obr. 17c). Kinetika indukce byla u buněk *rad6Δ* velmi podobná kinetice indukce u buněk *prp45(1-169)*. Dvojitá mutace však způsobila, že se kinetika indukce tohoto genu velmi snížila. Tyto výsledky interpretujeme tak, že alela *prp45(1-169)* negativně geneticky interaguje s deleční alelou *RAD6* na úrovni indukce genu *PHO5*.

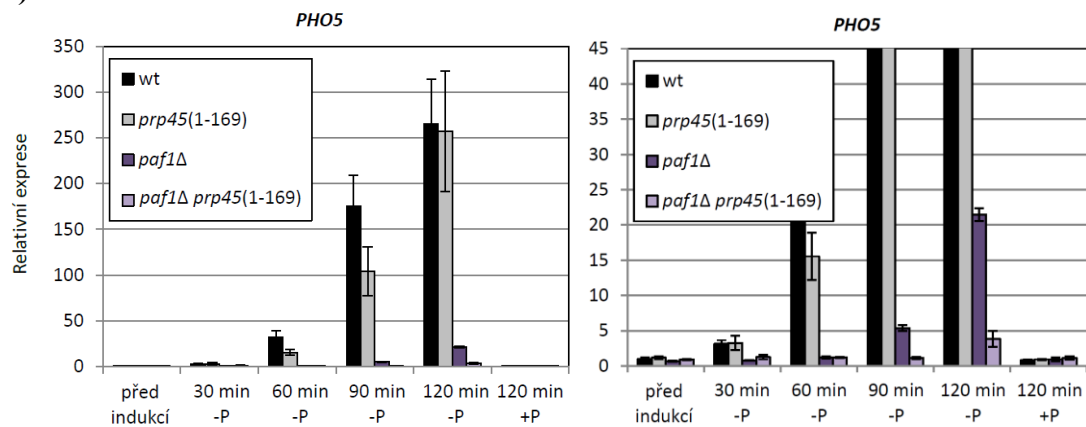
Jak už bylo rozebráno v Literárním úvodu, gen *RAD6* kóduje ubiquitin-konjugacíni enzym, který zprostředkovává ubiquitylaci histonu H2B na lysinu 123 (Robzyk et al. 2000). Při testování genetických interakcí na úrovni růstu jsme pozorovali negativní genetické interakce mezi *prp45(1-169)* a delečními alelami genů zprostředkovávajícími ubiquitylaci H2BK123 (*RAD6*, *BRE1*, *LGE1*) a naopak pozitivní genetické interakce s delečními alelami genů, které se účastní deubiquitylace H2BK123 (dr. A. Valentová, nepublikované výsledky, viz Obr. 15). Zajímalo nás proto, zda bude tato pozitivní genetická interakce patrná i na úrovni indukce genu *PHO5*. Z obrázku 17d je patrné, že kinetika indukce je u buněk *ubp8Δ* podobná kinetice indukce u buněk *prp45(1-169)* a dvojitá mutace kinetiku indukce zhoršovala jen velmi mírně. Pozitivní genetická interakce mezi *ubp8Δ* a *prp45(1-169)* pozorovaná na úrovni růstu se tedy na úrovni indukce genu *PHO5* neprojevila.

Posledním faktorem, u kterého jsme testovali vliv jeho delece samostatně i v kombinaci s mutací *prp45(1-169)* na indukci genu *PHO5*, byl *Set1* (Obr. 17e). Dereprese genu *PHO5* u dvojitě mutanty v médiu se standardní koncentrací fosfátu, kterou jsem pozorovala při pokusech dělaných v rámci mé diplomové práce, se v takové míře jako v předchozích pokusech neprojevila. Derepresi exprese genu *PHO5* v buňkách s jednoduchou delecí genu *SET1*, kterou jsme očekávali na základě literatury (Carvin & Kladde 2004), jsme pozorovali jen mírnou. Kinetika indukce genu *PHO5* po přenosu do média bez fosfátu byla u buněk *set1Δ* podobná jako u buněk *prp45(1-169)* a u dvojitě mutanty zůstala nezměněna. Alely *set1Δ* a *prp45(1-169)* tedy mají na této úrovni mezi sebou epistatický vztah.

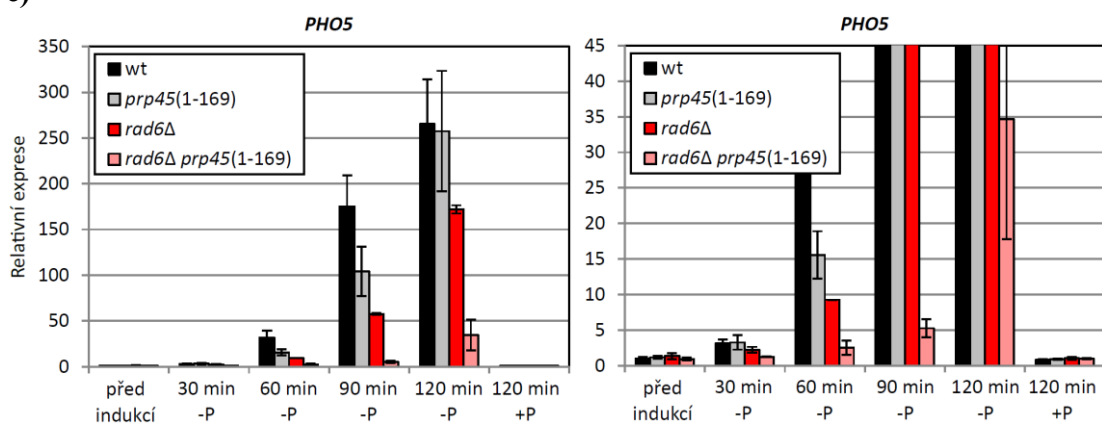
a)



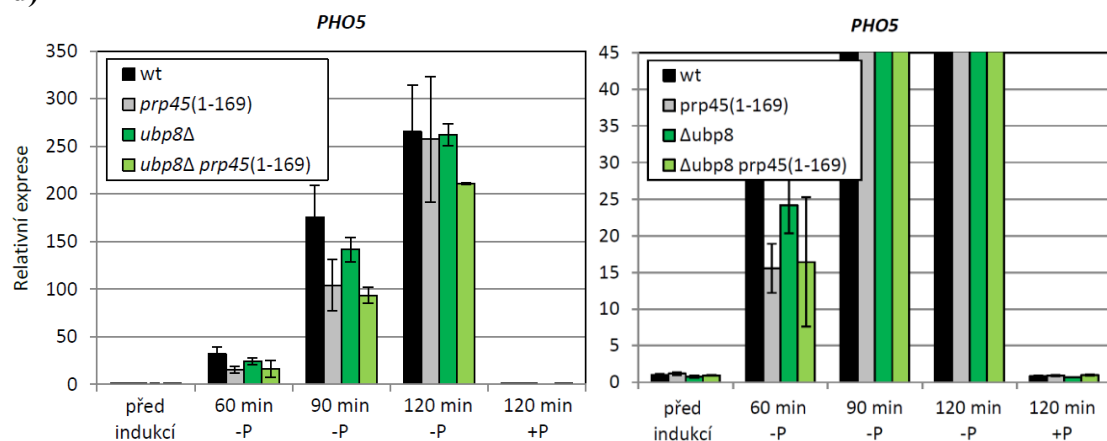
b)



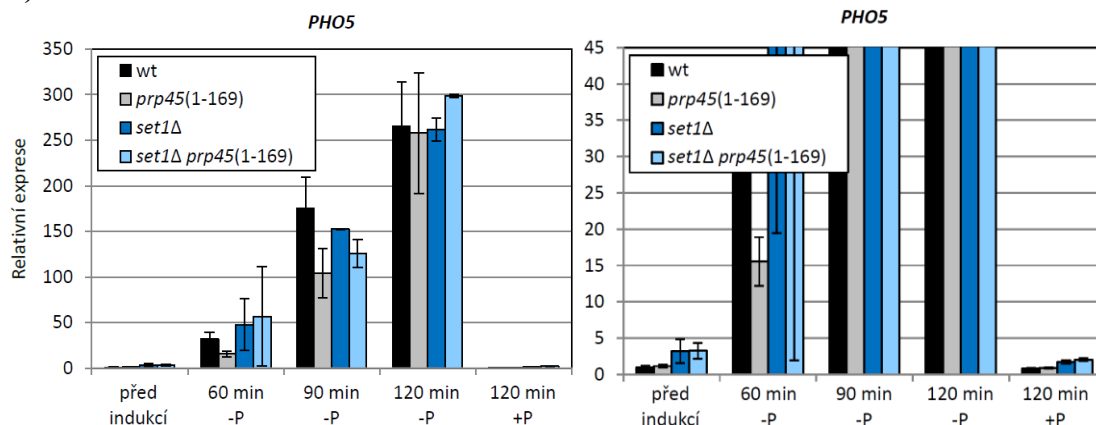
c)



d)



e)



Obr. 17 Časoběrný experiment potvrdil negativní genetickou interakci na úrovni indukce genu *PHO5* mezi *prp45(1-169)* a *rad6Δ* a odhalil epistatickou interakci mezi *prp45(1-169)* a *set1Δ*. Hladina transkriptu genu *PHO5* byla pomocí qPCR měřena v médiu se standardní koncentrací fosfátu (+P) a v různých časech po přenosu do indukčních podmínek (-P). Grafy v pravé části jsou výřezem grafu v levé části (srov. měřítko osy y). Data byla normalizována na hladinu exprese genu *TOM22* a vztažena k hladině divokých buněk v médiu se standardní koncentrací fosfátu před provedením indukce. Úsečky znázorňují směrodatné odchylky tří technických triplicátů qPCR v případě experimentu s *BUR2* a směrodatné odchylky dvou biologických replikátů v případě ostatních pokusů.

Z výsledků vyplývá, že Prp45 ovlivňuje kinetiku indukce genu *PHO5* (a také *GALI-10*; A. Valentová, nepublikované výsledky). Tento výsledek je významný z toho důvodu, že geny *PHO5* ani *GALI-10* neobsahují intron a Prp45 je sestříhový faktor. Vzhledem k pozorované negativní genetické interakci mezi alelami genů *PRP45* a *RAD6* a epistatické interakci mezi geny *PRP45* a *SET1* je možné, že Prp45 ovlivňuje indukci genů bez intronu skrze změny v histonových modifikacích. Ubiquitinylace H2BK123, která je zprostředkována enzymem Rad6, už v literatuře spojena s ovlivněním sestříhu byla (viz Literární přehled).

5.2.3. Delece genů pro regulátory elongace transkripce a efekторы chromatinových modifikací neprohlubují sestříhový fenotyp buněk *prp45(1-169)*

Vzhledem k tomu, že se Prp45 podílí i na regulaci sestříhu (Gahura et al. 2009), zajímalo nás, zda se mutace *prp45(1-169)* a současná delece jednoho z genů kódujících regulátory elongace transkripce nebo současná delece jednoho z genů pro efekторы chromatinových modifikací projeví také na sestříhu pre-mRNA (Obr. 18). U buněk s dvojitou mutací a u buněk s mutacemi zvlášť jsme se proto pomocí qPCR rozhodli změřit hladinu mRNA a pre-mRNA některých intron-obsahujících genů. Na základě výsledků experimentů získaných metodou “primer extension” (viz kapitola 5.1.3), kterou byly detekovány jednotlivé typy RNA související se sestříhem (pre-mRNA, lariát-exon 2 a mRNA) u plazmidových konstruktů obsahujících intron testovaného genu a které byly v naší laboratoři provedeny dr. O. Gahurou a Mgr. M. Oplovou ((Gahura et al. 2011), M.

Oplová, 2015 a nepublikovaná data), byly pro testování vybrány čtyři geny - *ECM33*, *ACT1*, *MAF1* a *COF1* (pozn.: v té době jsme ještě neměli k dispozici celogenomová transkriptomická data získaná metodou RNA-seq). *ECM33* a *ACT1* jsou silně exprimované geny, které se, jak odhalila metoda “primer extension”, v buňkách *prp45(1-169)* sestřihují relativně dobře. Naproti tomu sestřih genů *MAF1* a *COF1* byl u těchto buněk silně narušen. Použití genů *MAF1* a *COF1* mělo za cíl zvýraznit případné sestřihové defekty u testovaných dvojitých mutant.

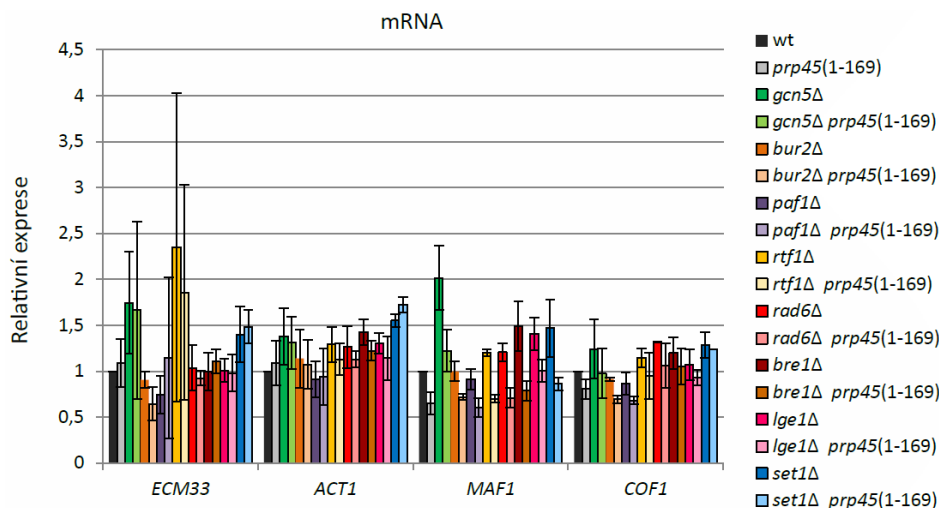
Hladiny mRNA genů *ACT1* a *COF1* byly napříč kmeny velmi podobné hladině u divokých buněk (Obr. 18a). U genu *ECM33* byla hladina u většiny testovaných kmenů také na úrovni divokých buněk, ale u některých kmenů jsou kvůli velkým směrodatným odchylkám výsledky nekonkluzivní. Narozdíl od pokusů provedených metodou “primer extension” nebyl pozorován tak výrazný pokles hladiny mRNA genu *COF1* u buněk *prp45(1-169)*. Může to být způsobeno tím, že metoda “primer extension” měří mRNA rekombinantního substrátu, ne endogenní mRNA. Je zajímavé, že v předchozích pokusech měření hladiny endogenní mRNA genu *COF1* pomocí qPCR provedených dr. O. Gahurou patrný pokles byl (Obr. 9d). Příčina této diskrepance není jasná.

Narozdíl od genu *COF1* u genu *MAF1* pokles hladiny mRNA u buněk *prp45(1-169)* pozorován byl, což je tentokrát s výsledky získanými metodou “primer extension” s využitím rekombinantních substrátů v souladu. Tento pokles, v rozsahu 1,4 - 1,9-násobného snížení exprese genu *MAF1*, byl patrný u všech kmenů nesoucích dvojitou mutaci ve srovnání s kmenem s jednoduchou delecí některého z genů pro regulátory elongace transkripce nebo efekty chromatinových modifikací. Výraznější změna exprese *MAF1* byla pozorována jen u buněk *gcn5Δ* a *gcn5Δ prp45(1-169)*. Gen *GCN5* kóduje histonacetyltransferázu specifickou pro N-konce histonů H2B a H3 (Suka et al. 2001; Zhang et al. 1998; Grant et al. 1997; Ruiz-García et al. 1997). Hladina mRNA genu *MAF1* byla u těchto buněk zhruba 2x zvýšená oproti divokým buňkám respektive oproti buňkám *prp45(1-169)*.

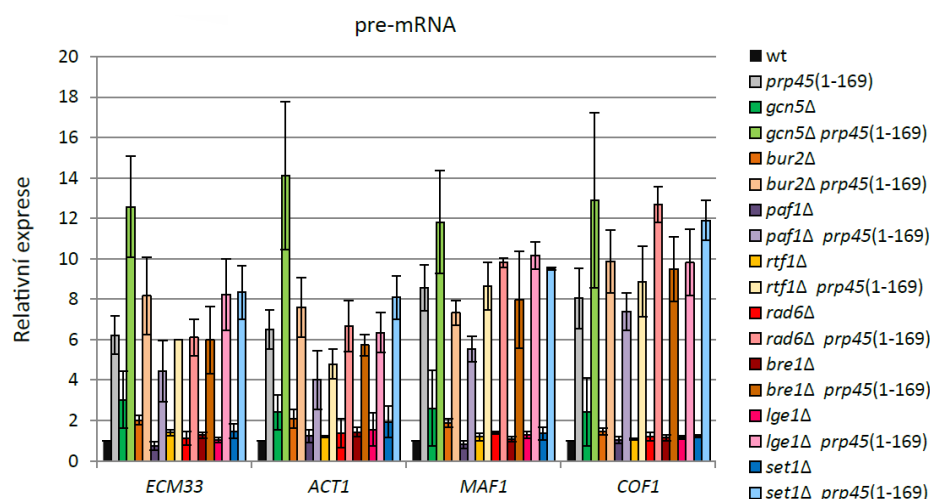
Měření hladin pre-mRNA ukázalo, že u buněk s jednoduchou delecí některého z genů kódujících regulátory elongace transkripce nebo efekty chromatinových modifikací ve většině případů nedochází k akumulaci pre-mRNA (Obr. 18b). Určitými výjimkami jsou kmen s delecí genu *GCN5*, u kterých je statisticky významné zvýšení hladiny pre-mRNA genů *ECM33* a *ACT1* na 3-násobek respektive 2,5-násobek hladiny v divokých buňkách, a kmen s delecí genu *BUR2*, ve kterém vzrostla hladina pre-mRNA u všech čtyřech testovaných genů v rozmezí 1,5 - 2-násobku hladiny u divokých buněk.

Hladiny pre-mRNA u dvojitých mutant se opět vesměs nelišily od hladiny v buňkách s mutací *prp45(1-169)*. Na první pohled by se mohlo zdát, že výjimkou byly buňky *prp45(1-169) gcn5Δ*. Zvýšená hladina pre-mRNA však byla pozorována už u buněk *gcn5Δ*, proto lze zvýšenou hladinu u dvojitě mutanty očekávat. Ve skutečnosti je poměr nárůstu hladiny pre-mRNA testovaných genů u buněk *prp45(1-169) gcn5Δ* ve srovnání s buňkami *gcn5Δ* trochu nižší než poměr nárůstu hladiny pre-mRNA u buněk *prp45(1-169)* oproti divokým buňkám. Stejný efekt byl pozorován i u buněk *bur2Δ prp45(1-169)*, u kterých byla hladina pre-mRNA testovaných genů prakticky stejná jako u buněk *prp45(1-169)*. Vzhledem k mírně zvýšené hladině pre-mRNA u buněk *bur2Δ* by byl u dvojitě mutanty přiměřený nárůst také očekáván.

a)



b)

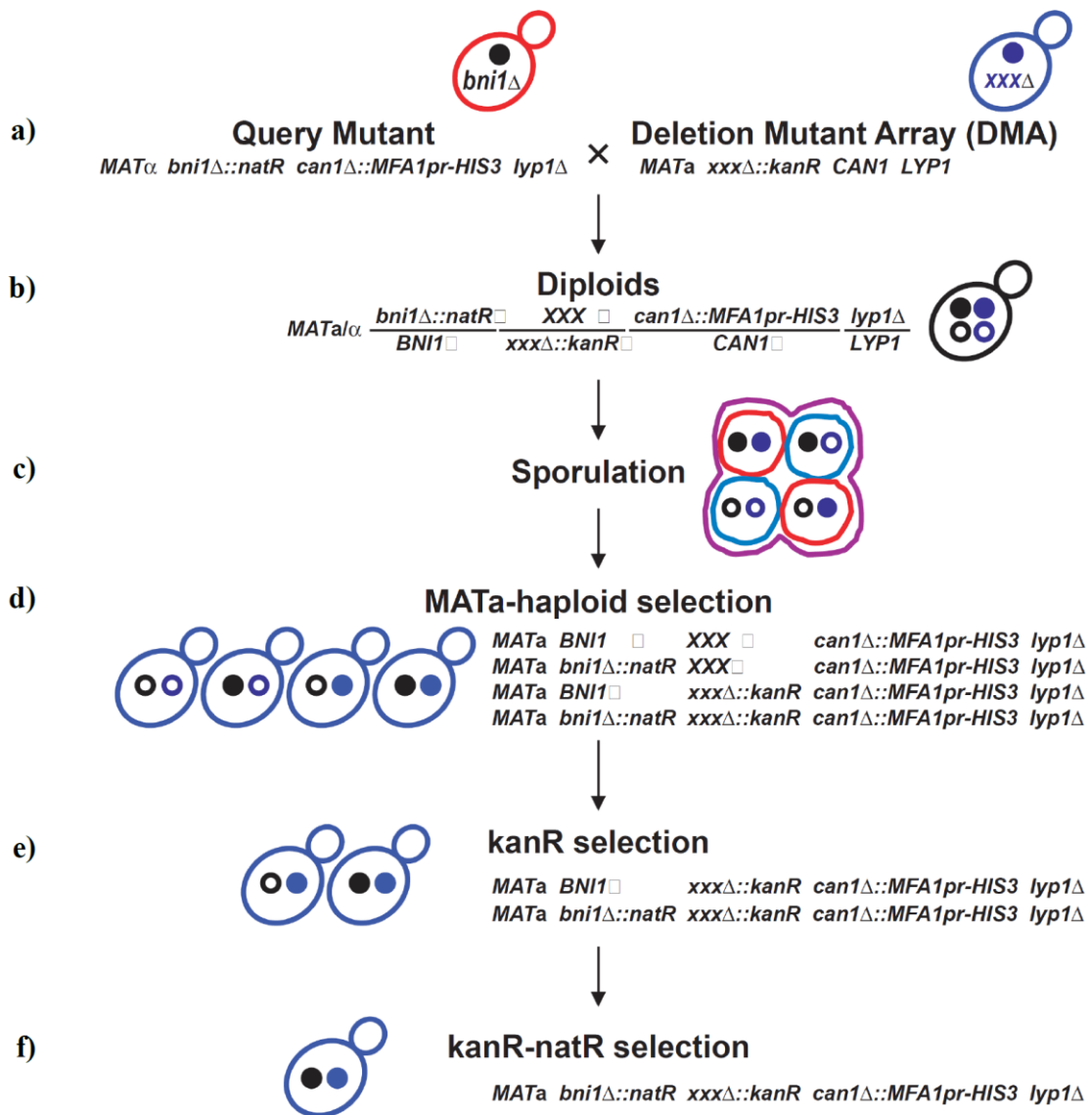


Obr. 18 Delece genů kódujících transkripční regulátory ani efekторы chromatinových modifikací neprohlubují sestřihový fenotyp buněk *prp45(1-169)*. Hladiny mRNA (a) a pre-RNA (b) byly měřeny pomocí qPCR. Hodnoty byly normalizovány na expresi genu *TOM22* a vztaženy na množství v divokých buňkách daného genu. Úsečky znázorňují směrodatné odchylky 3 - 5 biologických pokusů.

5.2.4. SGA

Jak bylo popsáno výše, testování genetických interakcí mezi *prp45(1-169)* a delečními alelami genů, které kódují elongační regulátory a modifikátory chromatinu, odhalilo pozitivní i negativní interakce. U mnoha dvojic ale genetické interakce na úrovni růstu zjištěny nebyly. Testovány však byly jen interakce s delečními alelami genů, které byly vytipovány na základě souvislosti s indukcí genů *PHO* a *GAL* (Carvin & Kladde 2004). Rozhodli jsme se proto rozšířit testování na celogenomovou úroveň a využít metodu “Synthetic genetic array”, SGA. Toto testování bylo provedeno ve spolupráci s prof. Perem Sunnerhagenem a Beidongem Liu na Göteborgs Universitet ve švédském Göteborgu, kde jsem v rámci svého doktorského studia absolvovala tříměsíční stáž.

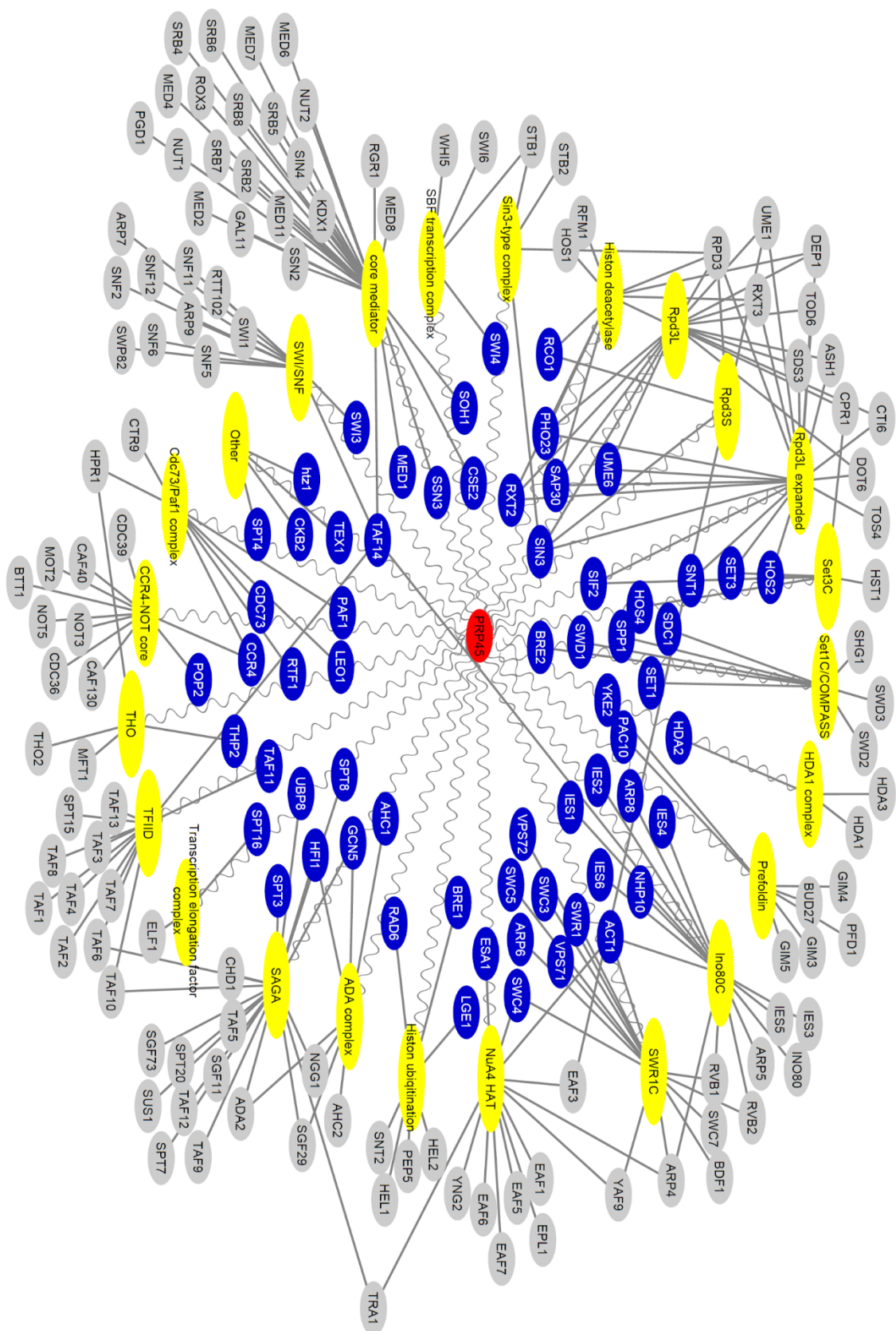
Postup metody SGA je rozepsán na obrázku 19. Stručně řečeno, metoda SGA spočívá v tom, že se testovací (“query”) kmen nesoucí mutaci zájmu zkříží s knihovnou kmenů, ve které každý kmen nese delecí jednoho neesenciálního genu. Paralelně se kříží i kontrolní kmen, který nenese mutaci zájmu, ale jinak obsahuje stejné selekční markery jako testovací kmen. Ve vzniklých diploidních kmenech je poté indukována sporulace. Následuje několik kol selekce, pomocí kterých jsou získány pouze kmeny nesoucí dvojitou mutaci. Růst těchto kmenů je pak testován za různých podmínek. Velikost kolonií je poté počítačově porovnávána s velikostí kolonií kontrolního kmene a z těchto údajů je vypočtena “fitness”. Počítačové vyhodnocení výsledků SGA bylo provedeno prof. Ch. Boonem na univerzitě v kanadském Torontu.



Obr. 19 Postup testování metodou SGA. (a) Jako příklad alely, jejíž genetické interakční partnery jsou hledány, je zde deleční alela genu *BNI1*. Pro SGA je nutné, aby tato delece byla vytvořena pomocí genu zajišťujícího rezistenci k antibiotiku nourseothricin (*natR*). Další důležité mutace v testovacím (“query”) kmeni jsou *lyp1 Δ* a *can1 Δ ::MFA1pr-HIS3*. Gen *LYP1* kóduje permeázu pro lysin a delece tohoto genu zajišťuje rezistenci k toxickému lysinovému analogu thialysinu. Mutace *MFA1pr-HIS3* zajišťuje

expresi genu *HIS3* (který je jinak ve svém endogenním lokusu deletován) z promotoru *MFAl*, což je gen kódující feromon *a* exprimovaný pouze buňkami párovacího typu *a*. Jen buňky párovacího typu *a* jsou tedy schopny přežít na médiu bez histidinu. Celý konstrukt *MFAlpr-HIS3* je navíc vložen do lokusu genu *CAN1*, čímž dochází k inaktivaci *CAN1*. Gen *CAN1* kóduje permeázu pro arginin a tato delece zajišťuje buňkám rezistenci ke canavaninu, což je toxický analog argininu. Kmen z knihovny delečních mutant (DMA) obsahuje delecí neesenciálního genu, která byla vytvořena pomocí genu zajišťujícího rezistenci k antibiotiku geneticin (*kanR*). **(b)** Po zkřížení testovacího kmene s kolekcí deletant jsou diploidní kmeny selektovány na médiu obsahujícím antibiotika nourseothricin a geneticin. **(c)** Diploidní kmeny jsou poté přeneseny na sporulační médium, které indukují sporulaci. **(d)** Pro další postup je nutno odstranit diploidy a nechat spory vyklíčit. Navíc je potřeba zajistit, aby vyklíčily jen spory jednoho párovacího typu, v našem případě *a*, aby nedocházelo k opětovnému křížení mezi buňkami vyrostlými ze spor. Všechny tyto požadavky jsou zajištěny médiem bez histidinu, které z důvodů popsaných výše umožní růst jen buňkám s párovacím typem *a*, a které zároveň obsahuje canavanin a thialysin. Tyto analogy zabijí všechny buňky s divokými alelami *LYP1* a *CAN1*, tedy kromě některých haploidních kmenů i všechny diploidy. **(e)** Následuje přenesení buněk na médium s geneticinem, které zajistí růst jen buňkám s delecí příslušného genu z kolekce. **(f)** Dvojitě mutanty jsou nakonec vyselektovány na médiu s geneticinem a nourseothricinem. Převzato z (Tong & Boone 2006), upraveno.

V našem případě byl kmen s mutací *prp45*(1-169) křížen s deleční knihovnou, která obsahovala 4323 kmenů. Růst dvojitých mutant byl testován při normální kultivační teplotě 30 °C a při zvýšené teplotě 35 °C. Za synteticky negativní genetickou interakci byly považovány všechny dvojitě mutace, které zhoršovaly růst kmenů o více než 15 %. Některé méně konkluzivní výsledky byly ověřeny opětovným křížením provedeným ručně a měřením růstové křivky pomocí přístroje Bioscreen (provedla dr. K. Abrahámová). Celkem bylo nalezeno 183 delečních alel, které negativně geneticky interagovaly s mutací *prp45*(1-169) (Obr. 20). Mezi interaktory patřilo mnoho genů, jejichž proteinové produkty jsou součástí komplexů regulujících elongaci transkripce (FACT, SAGA, PAF, prefoldinový komplex). Významnou skupinu interaktorů tvořily rovněž geny, jejichž proteinové produkty jsou součástí acetylačních (NuA4), deacetylačních (Set3, Rpd3L, Rpd3S), methylačních (COMPASS) a deubiquitinylačních (SAGA) komplexů. Jeden z nejzajímavějších výsledků byl nález, že mezi nejsilnější genetické interaktory alely *prp45*(1-169) patřila deleční alela genu *HTZ1* a deleční alely genů, jejichž proteinové produkty kódují komponenty komplexu SWR1. Genetická interakce byla rovněž pozorována také s delečními alelami kódujícími komponenty komplexu INO80. Jak bylo popsáno v kapitole 2.2.3, gen *HTZ1* kóduje histonovou variantu H2A.Z. Komplex SWR1 se účastní inkorporace Htz1 do chromatinu a komplex INO80 participuje na jeho odstranění. Htz1 je tedy další protein se vztahem k Prp45, který zároveň souvisí i s regulací transkripce a se strukturou chromatinu. V průběhu těchto pokusů byly publikovány studie, které spojily funkci Htz1 se sestřihem pre-mRNA (viz Literární úvod, kapitola 2.3.3.) (Neves et al. 2017; Nissen et al. 2017). Proto jsme se rozhodli prozkoumat funkční souvislost mezi Htz1 a Prp45 blíže.



Obr. 20 Genetické interakty mutanty *prp45(1-169)*. Červeně - *PRP45*. Žlutě - komplexy se vztahem k transkripci a modifikacím chromatinu. Modře - genetickí interaktoři *PRP45*. Šedě - komponenty

komplexů se vztahem k transkripci a modifikacím chromatinu, které nebyly testovány nebo s ním nebyla nalezena genetická interakce.

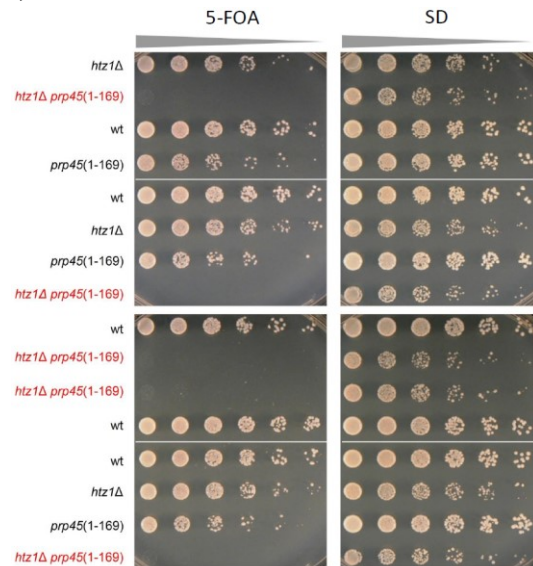
5.2.5. Alela *prp45*(1-169) vykazuje silnou negativní syntetickou interakci s delečními alelami genů kódujících komponenty komplexu SWR1 a *HTZ1*

Silnou negativní genetickou interakci mezi *prp45*(1-169), *htz1*Δ a delečními alelami genů kódujících komponenty komplexu SWR1 jsme se nejprve rozhodli ověřit nezávisle v buňkách s genetickým pozadím BY474x. Buňky *htz1*Δ, *swr1*Δ, *vps71*Δ, *vps72*Δ, *swc3*Δ a *swc5*Δ (všechny genetického pozadí BY4741) byly zkříženy s kmenem AVY18, tedy takovým, který nese mutaci *prp45*(1-169) v genetickém pozadí BY4742. V buňkách byla indukována sporulace a spory z jednotlivých věcek byly odděleny pomocí mikromanipulátoru. Po vyklíčení byly buňky genotypovány a pro zjištění růstových defektů byl proveden kapkový test.

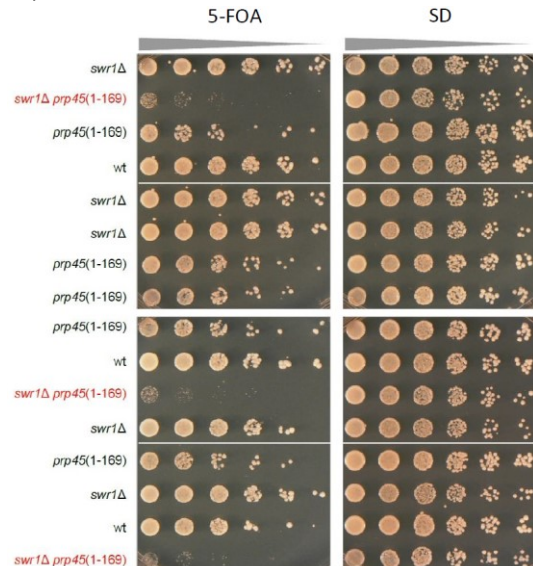
Protože negativní genetická interakce byla podle výsledků SGA velmi silná, diploidní kmeny byly transformovány plasmidem nesoucím divokou alelu *PRP45* a gen *URA3* jako selekční marker (kmeny s genetickým pozadím BY474x mají endogenní *URA3* deletován). Během indukce sporulace byly buňky v podmínkách bez uracilu, takže si plasmid udržely. Buňky s divokým genem *URA3* mohou být selektovány jak pozitivně (růstem na médiu bez uracilu), tak negativně. Negativní selekce je zprostředkována přidáním 5-fluoroorotové kyseliny (5-FOA) do média, která je enzymatickým produktem genu *URA3* přeměňována na 5-fluorouracil, který je pro buňky toxický. V případě, že je genetická interakce mezi *prp45*(1-169) a delecí daného genu lethální, buňky si musejí podržet plasmid s divokou alelou *PRP45* a kvůli genu *URA3*, který slouží jako selekční marker, nepřežijí na médiu s 5-FOA.

Výsledky kapkového testu shrnuje obrázek 21. Jak je vidět, všechny testované dvojité mutanty vykazují silnou syntetickou negativní genetickou interakci, protože špatně rostou na médiu obsahujícím 5-FOA. Nejsilnější efekt v testovacích podmínkách, syntetickou lethality, vykazují buňky *prp45*(1-169) *htz1*Δ (obr. 21a).

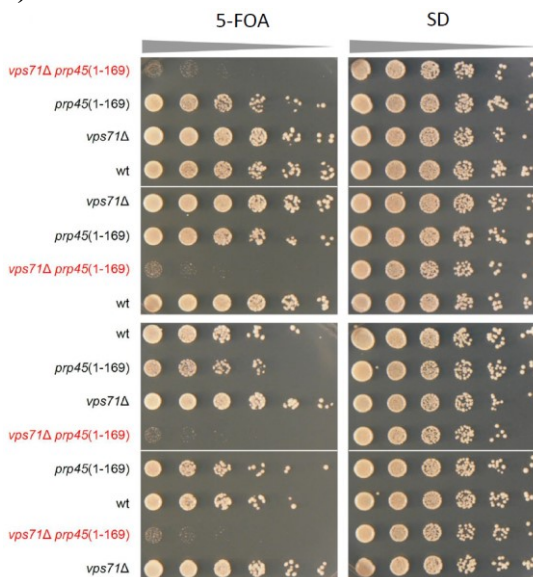
a)



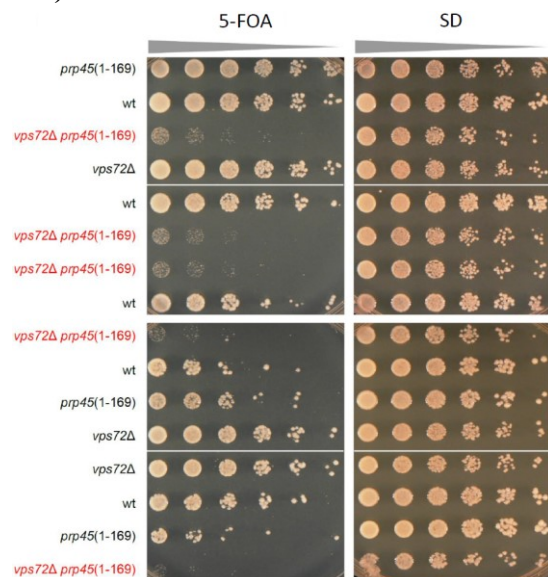
b)

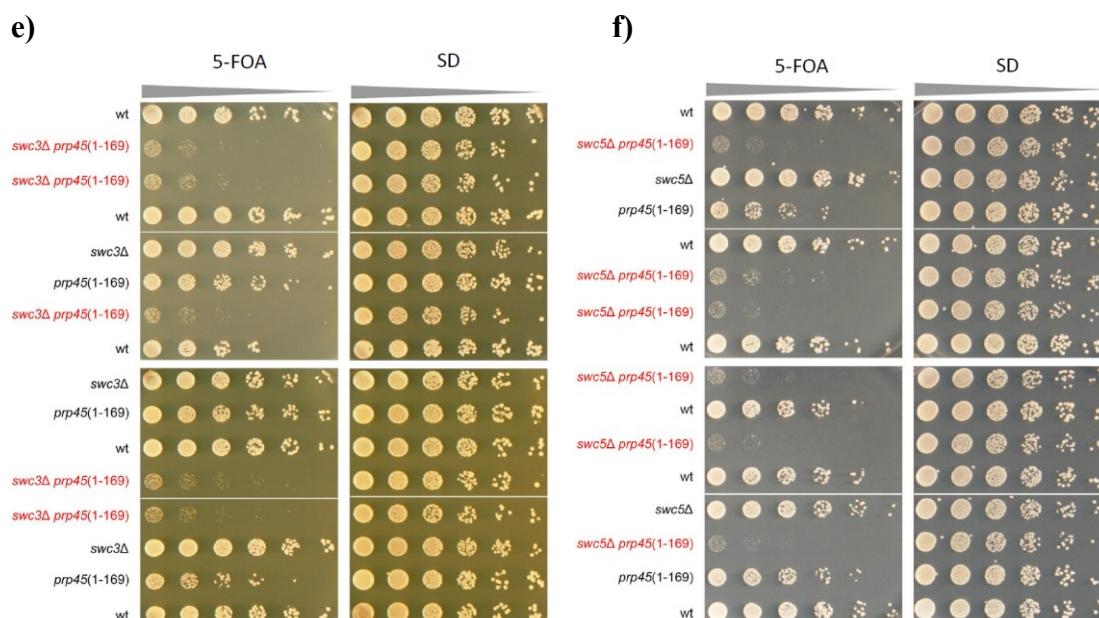


c)



d)





Obr. 21 Alela *prp45(1-169)* negativně geneticky interaguje s delečními alelami genů *HTZ1* a delečními alelami genů, které kódují komponenty komplexu SWR1. Panely zobrazují růst tetrád vzniklých křížením buněk *prp45(1-169)* a *htz1Δ* (a), *swr1Δ* (b), *vps71Δ* (c), *vps72Δ* (d), *swc3Δ* (e) a *swc5Δ* (e). Růst buněk byl testován na minimálním médiu s 5-FOA, minimální médium sloužilo jako kontrola. Buňky byly na médium nanášeny v ředící řadě s ředícím faktorem 5. Na obrázku je situace po dvou dnech růstu ve 30 °C.

5.2.6. Alela *prp45(1-169)* nemění relativní expresi ani relativní účinnost sestřihu intronických genů vázajících Htz1

V době, kdy byly dělány pokusy s genetickými interakcemi mezi *prp45(1-169)* a delečními alelami genů kódujících Htz1 a proteiny funkčně související s Htz1, vyšly publikace, které ukazovaly na funkční propojení Htz1 se sestřihem a transkripcí (viz kapitola 2.3.3. (Neves et al. 2017; Nissen et al. 2017)). Zajímalo nás proto, zda deleční alela genu *HTZ1* bude nějak interagovat s alelou *prp45(1-169)* na úrovni ovlivnění sestřihu pre-mRNA. Buňky nesoucí dvojitou mutaci nejsou viabilní, proto jsme přistoupili k transkriptomické analýze *in silico*.

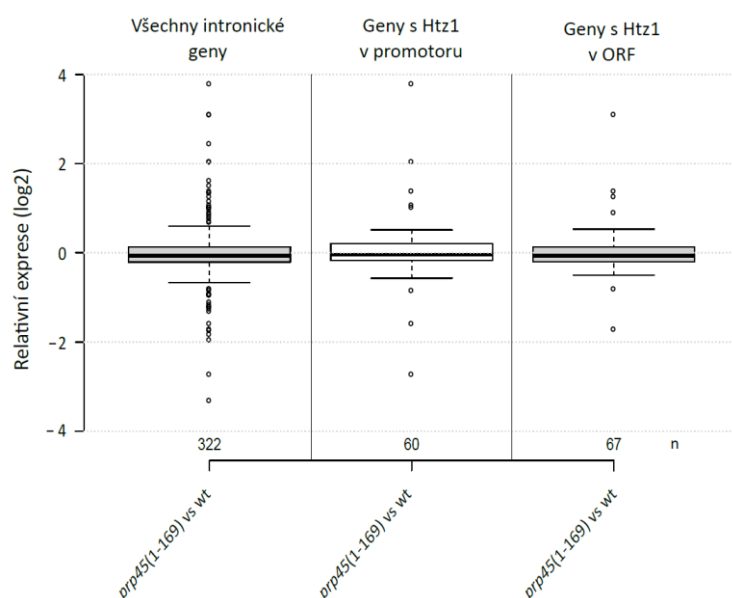
Z článku (Gu et al. 2015) byla stažena primární sekvenční data získaná metodou ChIP-seq, kterou autoři zjišťovali fyzickou lokalizaci Htz1 na genomu *S. cerevisiae*. Primární analýza dat byla provedena dr. M. Převorovským. Genů, které u *S. cerevisiae* obsahují intron, bylo doposud identifikováno 344. Z těchto 344 genů jich Htz1 obsahovalo ve svém promotoru 63 a v otevřeném čtecím rámci 67. Genů s intronem s Htz1 v promotoru a současně v otevřeném čtecím rámci bylo 6.

Nejprve nás zajímalo, zda mutace *prp45(1-169)* neovlivňuje expresi intron-obsahujících genů s Htz1 v promotoru nebo v otevřeném čtecím rámci. Abychom mohli výsledky náležitě zhodnotit, nejprve jsme zjišťovali, zda u buněk *prp45(1-169)* nedochází ke změnám exprese globálně u všech genů s intronem. Analýza však výrazné

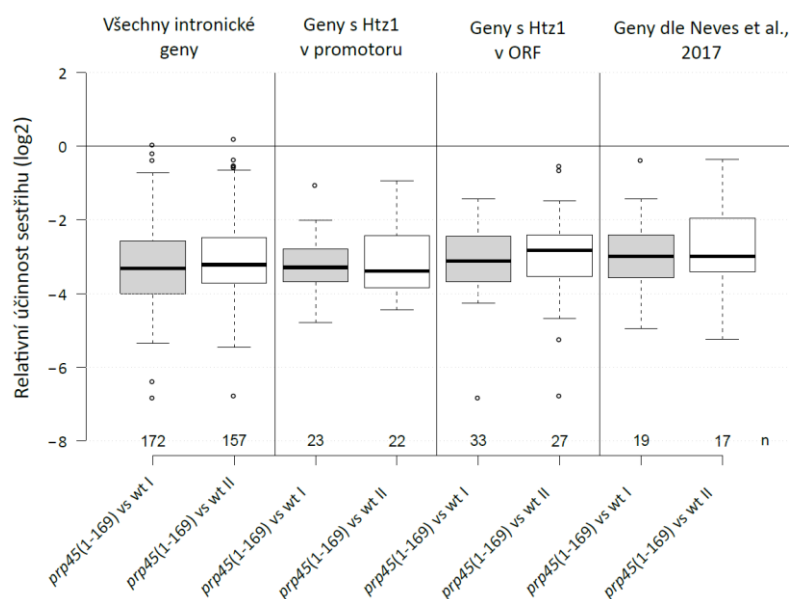
rozdíly neodhalila (Obr. 22a). Porovnání relativní exprese intronických genů obsahujících Htz1 také žádné změny neodhalilo, ani u genů s Htz1 v promotoru, ani u genů s Htz1 v otevřeném čtecím rámci.

Dále nás zajímalo, zda u intron-obsahujících genů s Htz1 v promotoru nebo v otevřeném čtecím rámci není prohloubený defekt v relativní účinnosti sestřihu u buněk *prp45(1-169)* vůči divokým buňkám. Ani tady však žádná změna nalezena nebyla (Obr. 22b). V článku (Neves et al. 2017) byly metodou RNA-seq identifikovány geny, které vykazovaly zhoršený sestřih u buněk *htz1Δ*. Zjišťovali jsme proto také to, zda mutace *prp45(1-169)* neprohlubuje defekt v účinnosti sestřihu specificky těchto genů. Ani v tomto případě jsme však žádnou změnu neodhalili (Obr. 22b).

a)



b)



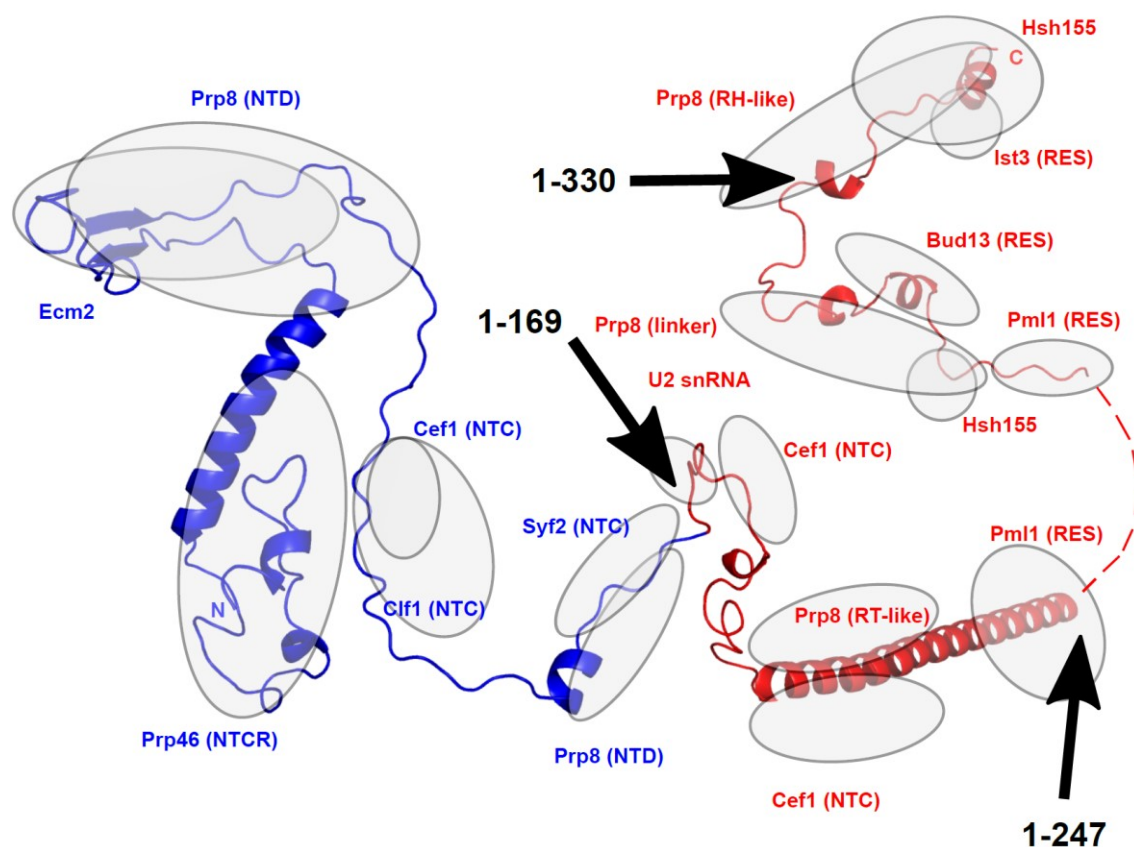
Obr. 22 U buněk *prp45(1-169)* nedochází k relativní změně exprese ani k relativní změně účinnosti sestřihu intronických genů vázajících Htz1. (a) Graf znázorňující relativní expresi (log₂)

vybraných skupin genů obsahujících intron. **(b)** Relativní účinnost sestřihu (\log_2) u vybraných skupin intron obsahujících genů (viz popisky nad grafem). Dva boxploty od každé skupiny reprezentují výsledky dvou biologických replikátů RNA-seq. n je počet genů zahrnutý do analýzy u daného boxplotu.

5.2.7. Mutanty *prp45*(1-247) a *prp45*(1-330)

Ačkoliv transkriptomická analýza provedená *in silico* neodhalila změny v relativní expresi ani prohloubení defektu v relativní účinnosti sestřihu u buněk *prp45*(1-169) vůči divokým buňkám u intron obsahujících genů vázajících Htz1, chtěli jsme přece jen blíže prozkoumat, zda spolu alely *prp45* a *htz1* na různých úrovních (např. na úrovni sestřihu, na úrovni indukibility genů *PHO*, atd.) geneticky neinteragují. Buňky *prp45*(1-169) *htz1* Δ však nejsou viabilní (viz obr. 21a). Rozhodli jsme se proto připravit buňky s dalšími mutacemi v *PRP45* a doufali jsme, že nalezneme takové, které budou v kombinaci s delecí genu *HTZ1* životaschopné a budeme tedy s nimi moci dále pracovat.

Na základě strukturních studií spliceosomu založených na kryoelektronové mikroskopii, které umožnily identifikovat interakční partnery Prp45 (Yan et al. 2015; Yan et al. 2016; Yan et al. 2017; Galej et al. 2016; Rauhut et al. 2016; Ruixue Wan et al. 2016; Bertram et al. 2017; Fica et al. 2017), jsme se rozhodli připravit metodou “knock-in” C-terminální zkráceniny *prp45*(1-247) a *prp45*(1-330), které exprimují prvních 247 respektive 330 aminokyselin (Obr. 23). Proteinu *prp45*(1-247) chybí většina oblastí, se kterými fyzicky interagují komponenty komplexu RES, a dále tímto zkrácením přichází protein Prp45 o některé interakce s proteinem Prp8. Zkrácení o 49 aminokyselin (mutace *prp45*(1-330)) vede k odstranění platformy pro interakci s komponentou komplexu RES Ist3 a možná dochází i k omezení vazby s proteinem Prp8 prostřednictvím domény RH-like.

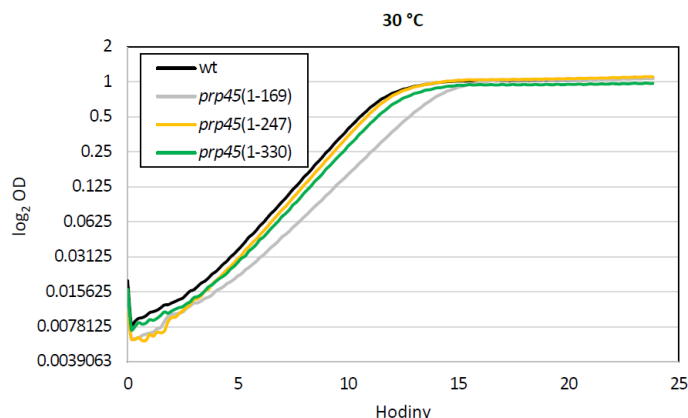


Obr. 23 Znázornění mutací Prp45 použitých v této práci. Obrázek znázorňuje strukturu Prp45 s jeho interakčními partnery (šedé ovály). Modře je znázorněno prvních 169 aminokyselin. Šipkami jsou pak znázorněny mutanty *prp45*(1-169), *prp45*(1-247) a *prp45*(1-330). Obrázek byl vytvořen na základě strukturních informací publikovaných v (Yan et al. 2016; Bertram et al. 2017). Převzato z (Hálová et al. 2017), upraveno.

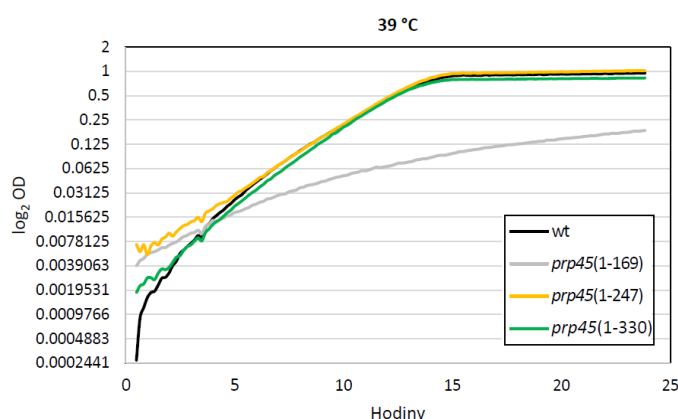
5.2.7.1. Charakterizace buněk *prp45*(1-247) a *prp45*(1-330)

Buňky nesoucí nové mutace *prp45*(1-247) a *prp45*(1-330) jsme se nejprve rozhodli blíže charakterizovat z hlediska růstových vlastností a z hlediska vlivu na sestřih pre-mRNA. Co se týká růstových vlastností, v přístroji Varioskan byly proměřeny růstové křivky, a to při běžné kultivační teplotě 30 °C (Obr. 24a) a při zvýšené teplotě 39 °C (Obr. 24b). Výsledky ukázaly, že ve 30 °C i ve 39 °C rostou buňky *prp45*(1-247) a *prp45*(1-330) stejnou rychlostí jako divoké buňky, zatímco buňky *prp45*(1-169) rostou už ve 30 °C pomaleji a ve 39 °C mají s růstem vážný problém.

a)

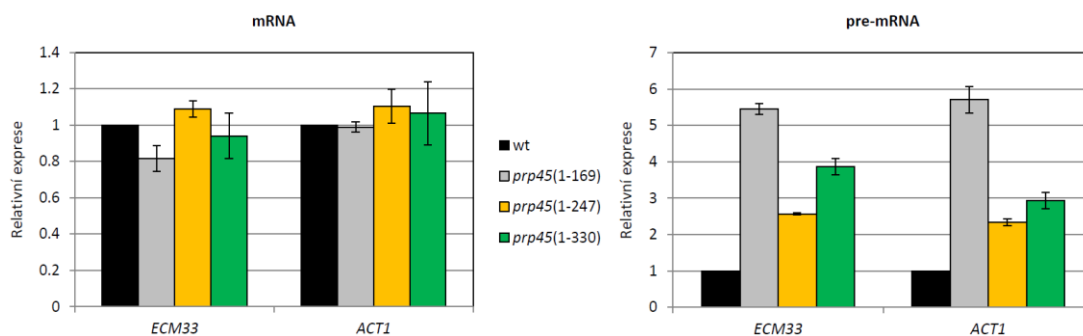


b)



Obr. 24 Buňky *prp45(1-247)* a *prp45(1-330)* se růstovými vlastnostmi ve 30 °C a 39 °C neliší od divokých buněk. Růstové křivky byly měřeny pomocí přístroje Varioskan. Naměřené hodnoty reprezentují jeden biologický pokus měření růstu ve 30 °C a jeden ze dvou biologických pokusů měření růstu při 39 °C. Hodnoty představují průměr dvou technických replikátů.

Pro charakterizaci sestřihu u daných mutant jsme přistoupili k měření hladin mRNA a pre-mRNA genů *ECM33* a *ACT1* pomocí qPCR. Jejich hladiny jsme porovnávali s hladinou v divokých buňkách a v buňkách s mutací *prp45(1-169)* (Obr. 25).

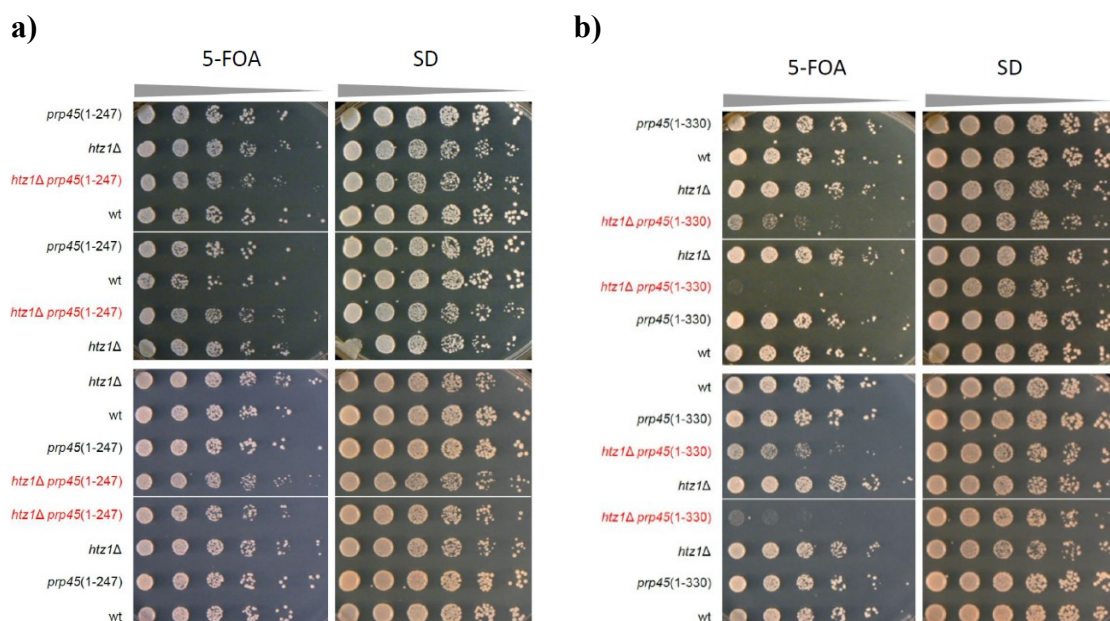


Obr. 25 Mutace *prp45(1-247)* a *prp45(1-330)* způsobují mírnou akumulaci pre-mRNA. Hladiny mRNA a pre-mRNA byly měřeny pomocí qPCR. Data byla normalizována na hladinu genu *TOM22* a vztažena na hodnotu naměřenou v divokých buňkách. Úsečky znázorňují směrodatné odchylky tří biologických pokusů.

Výsledky ukázaly, že se hladiny mRNA testovaných genů u mutant v porovnání s divokými buňkami příliš nelišily. Hladina pre-mRNA obou testovaných genů byla u buněk *prp45(1-169)* zhruba 5,5x zvýšena, což bylo očekáváno. U buněk nesoucích nově vytvořené mutanty *prp45(1-247)* a *prp45(1-330)* byla zvýšená hladina pre-mRNA obou testovaných genů pozorována také, nicméně defekt byl oproti mutantě *prp45(1-169)* slabší. Je zajímavé, že silnější fenotyp vykazuje mutace, která zkracuje protein Prp45 méně, tedy *prp45(1-330)*. Hladiny pre-mRNA genů *ECM33* a *ACT1* byly v buňkách s touto mutací zvýšeny 4x, respektive 3x. Buňky s více zkráceným Prp45, *prp45(1-247)*, akumulovaly pre-mRNA obou testovaných genů zhruba 2,5x.

5.2.7.2. *prp45(1-247)* a *prp45(1-330)* geneticky interagují s *htz1Δ*

Z výše uvedených výsledků vyplývá, že i mutace *prp45(1-247)* a *prp45(1-330)* způsobují akumulaci pre-mRNA. Rozhodli jsme se proto přistoupit k testování syntetických genetických interakcí mezi těmito alelami *PRP45* a deleční alelou *HTZ1*. Buňky nesoucí uvedené mutace v genu *PRP45* byly zkříženy s buňkami *htz1Δ*. Vzniklé diploidní buňky byly stejně jako v minulém pokusu transformovány plasmidem nesoucím divokou alelu *PRP45* a gen *URA3* jako selekční marker. Po sporulaci, rozmanipulování spor, jejich vyklíčení a genotypizaci byl proveden spottest. Testován byl opět růst buněk na minimálním médiu obsahujícím 5-FOA. Z výsledků vyplývá, že alela *prp45(1-247)* za testovacích podmínek nevykazuje měřitelnou genetickou interakci s alelou *htz1Δ* (Obr. 26a), zatímco alela *prp45(1-330)* ano (Obr. 26b). Stejně jako v případě akumulace pre-mRNA i tady se tedy projevilo to, že silnější fenotyp vykazují buňky s méně zkrácenou formou Prp45. Je zajímavé, že síla genetické interakce mezi *prp45(1-330)* a *htz1Δ* je u jednotlivých tetrád různá. Tento efekt jsme při předchozím testování genetických interakcí mezi *prp45(1-169)* a delečními alelami *HTZ1* a komponent komplexu SWR1 (Obr. 21) nepozorovali. Příčinu tohoto jevu neznáme, ale domníváme se, že může záviset na genetickém pozadí nebo na typu použitého testu. Kmeny BY4741 a BY4742 se vzájemně liší párovacím typem a auxotrofií na lysin a methionin. Analýza dvojitých mutant však neodhalila závislost síly interakce na kombinaci auxotrofií na lysin a methionin a/nebo párovacím typu. Tento jev tedy může záviset na jiných, experimentálně nesnadno postižitelných kombinacích alel. V předchozím testování byl také v buňkách přítomen plasmid exprimující divokou alelu *PRP45* a testování bylo prováděno na minimálním médiu s 5-FOA, zatímco zde byl test proveden bez plazmidu a na komplexním médiu. Zda je toto příčinou rozdílného chování buněk, však zůstává otázkou.

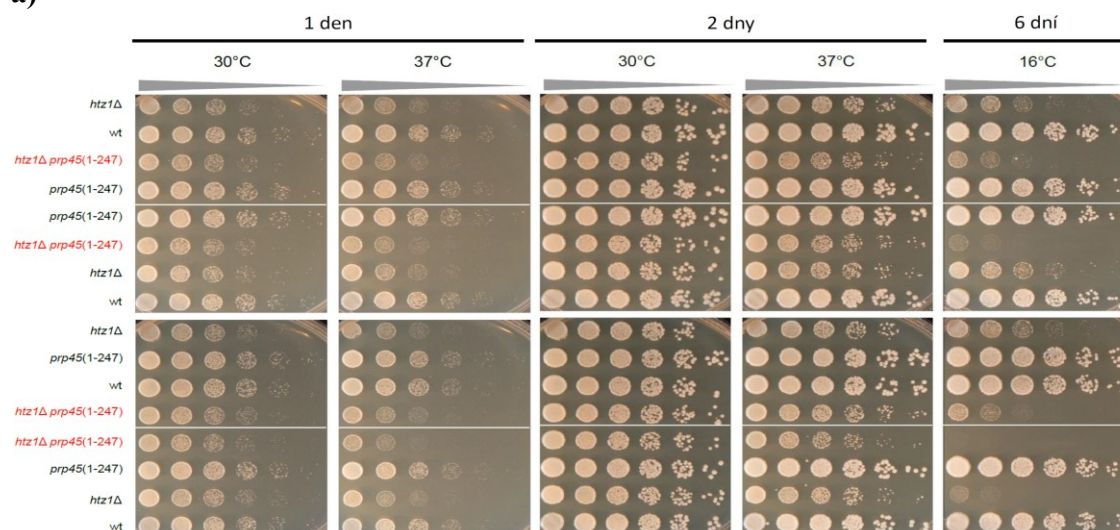


Obr. 26 Mezi alelami *htz1Δ* a *prp45(1-330)* dochází ke genetické interakci. Genetické interakce alel *prp45(1-247)* a *htz1Δ* (a) a *prp45(1-330)* a *htz1Δ* (b) byly testovány na minimálním médiu s 5-FOA. Buňky byly na médium nanášeny v ředící řadě s ředícím faktorem 5. Obrázek zachycuje situaci po dvou dnech růstu ve 30 °C.

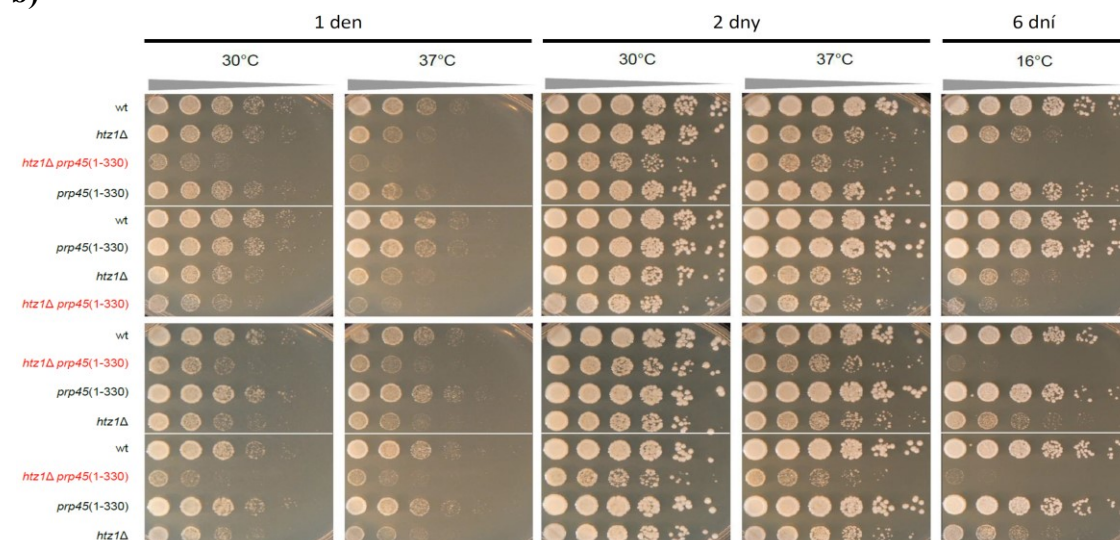
Odečet růstových schopností buněk zobrazených na obr. 26 po vícedenní kultivaci ukázal, že jsou dvojité mutanty viabilní. Abychom mohli s těmito buňkami provádět další analýzy, bylo nutné připravit kmeny *prp45(1-247) htz1Δ* a *prp45(1-330) htz1Δ* tak, aby neobsahovaly plasmid s divokou alelou *PRP45*. Buňky tedy byly opět zkríženy, byla indukována sporulace, spory z jednotlivých věček byly odděleny pomocí mikromanipulátoru a po vyklíčení genotypovány. Nejprve jsme ověřovali genetickou interakci mezi alelami *prp45* a *htz1Δ*, tentokrát ale bez podpory plazmidu s divokou alelou *PRP45*. Buňky vyklíčené vždy ze čtyř věček byly kultivovány, v ředící řadě s faktorem pět nanášeny na médium YPAD a pro zachycení jemnějších rozdílů v růstu byly kultivovány při 16, 30 a 37 °C.

Co se týká výsledků pro mutaci *prp45(1-247)* (Obr. 27a), ve 30 °C byly rozdíly v rychlosti růstu mezi jednotlivými kmeny patrné po jednom dni kultivace. Nárůst buněk nesoucích mutaci *htz1Δ* (ať už samostatně nebo v kombinaci s mutací *prp45(1-247)*) byl menší než nárůst divokých buněk nebo buněk *prp45(1-247)*. Rozdíly mezi buňkami *htz1Δ* a *htz1Δ prp45(1-247)* však nebyly v této teplotě postižitelné a po dvou dnech kultivace se rozdíly mezi všemi kmeny setřely úplně. Po jednom dni kultivace ve 37 °C byl také patrný menší nárůst buněk *htz1Δ* a *htz1Δ prp45(1-247)* oproti divokým buňkám a buňkám *prp45(1-247)*. Rozdíl v růstu mezi buňkami *htz1Δ* a *htz1Δ prp45(1-247)* patrný byl, ale velmi malý a jen u některých tetrád. Dvoudenní kultivace buněk při 37 °C tento malý rozdíl setřela, ale stále bylo patrné, že buňky s mutací *htz1Δ* (samostatně i v rámci dvojité mutace) rostou pomaleji než divoké buňky a buňky *prp45(1-247)*. Nejjasněji se rozdíl mezi kmeny projevil po 6 dnech růstu při 16 °C. Zatímco nárůst buněk *prp45(1-247)* byl stejný jako u divokých buněk, buňky se samostatnou mutací *htz1Δ*

a)



b)



Na rozdíl od výsledků pozorovaných pro mutaci *prp45*(1-247) byla genetická interakce mezi *htz1Δ* a *prp45*(1-330) patrná už po jednom dni kultivace ve 30 i 37 °C (Obr. 27b). Buňky s dvojitou mutací narostly o poznání hůře než ostatní kmeny a dvoudenní kultivace v daných teplotách rozdily v nárůstech sice trochu setřela, ale nevyrovnala, zvláště ne ve 37 °C. I zde jsou však patrné rozdíly mezi jednotlivými

čtveřicemi. Nejvýraznější rozdíly v růstu se opět projevily po 6 dnech kultivace při 16 °C, kdy dvojitá mutace byla pro buňky (téměř) lethální.

5.2.7.3. Vliv *htz1Δ* v kombinaci s *prp45(1-247)* a *prp45(1-330)* na hladinu pre-mRNA

Pokusy popsané v předcházející kapitole tedy potvrdily genetickou interakci na úrovni růstu mezi *htz1Δ* a alelami *prp45(1-247)* a *prp45(1-330)*. Buňky s dvojitou mutací jsou však na rozdíl od buněk *htz1Δ prp45(1-169)* viabilní, takže s nimi lze provádět další analýzy. Protože jak Prp45, tak Htz1 byly spojeny s regulací sestřihu, rozhodli jsme se pomocí qPCR porovnat hladiny mRNA a pre-mRNA genů *ECM33* a *COF1* u divokých buněk, u buněk *htz1Δ*, u buněk *prp45(1-247)* nebo *prp45(1-330)* a u odpovídajících dvojitých mutant. Výsledky nejsou úplně konkluzivní, ale určité trendy je možné vypožorovat. Hladiny mRNA obou testovaných genů zůstávají zhruba na stejné úrovni jako v divokém kmeni. Hladiny pre-mRNA jsou u buněk *htz1Δ* také přibližně stejné jako u divokých buněk, zatímco u jednoduchých mutant *prp45* dochází k akumulaci zhruba do té míry, jaká byla očekávána na základě předchozího pokusu (obr. 25). U buněk s dvojitou mutací je pak trend takový, že u buněk *htz1Δ prp45(1-247)* zůstává hladina pre-mRNA zhruba na stejné úrovni jako u buněk *prp45(1-247)*, zatímco u buněk *htz1Δ prp45(1-330)* se jeví hladina pre-mRNA trochu vyšší než u buněk s jednoduchou mutací *prp45(1-330)*. Zda jde však skutečně o výsledek genetické interakce na úrovni akumulace pre-mRNA, nejde z naměřených výsledků zatím jednoznačně určit.

6. Diskuse

6.1. Mutace Prp45 - zkracování interakční platformy

Sestřihový faktor Prp45 má neobvyklou extendovanou strukturu (je označován za “rope-like” protein; (Yan et al. 2019)) s vysokým podílem vnitřně neuspořádaných oblastí (Obr. 23). Funkci Prp45 jsme se pokusili charakterizovat pomocí zkrácených variant tohoto esenciálního proteinu. Varianta *prp45*(1-169), kódující N-koncovou část proteinu (aminokyseliny 1-169) bez konzervovaného motivu SNWKN (aminokyseliny 170-175), poskytuje termosenzitivní fenotyp (Gahura et al. 2009). Jak už bylo řečeno v Literárním úvodu (kapitola 2.4.), proteiny SNW, jejichž orthologem ze *Saccharomyces cerevisiae* je protein Prp45, jsou charakterizovány svým konzervovaným motivem SNWKN. Strukturní studie provedené pomocí kryoelektronové mikroskopie odhalily, že se tento motiv nachází v blízkosti katalytického místa spliceosomu, kde interaguje s U2 a U6 snRNA a s dalšími proteiny (Yan et al. 2015; Yan et al. 2016; Yan et al. 2017; Galej et al. 2016; Rauhut et al. 2016; Ruixue Wan et al. 2016; Bertram et al. 2017; Fica et al. 2017). Termosenzitivní fenotyp buněk *prp45*(1-169) však není způsoben pouhou absencí motivu SNW, protože mutace tohoto motivu nebo jeho delece k růstovému fenotypu nevedly a proteiny s těmito mutacemi plně komplementují růst buněk s delecí celého Prp45, a to i při zvýšené kultivační teplotě (Martinkova et al. 2002; Gahura et al. 2009).

Prp45 interaguje několika svými úseky s různými částmi proteinu Prp8 (s N-terminální doménou, s doménami “RT-like” a “RH-like” a se spojovací oblastí (“linker”)). N-koncová část Prp45 (aminokyseliny 1-169) interaguje kromě Prp8 s komponentami komplexu NTC - Cef1, Clf1, Syf2 a Prp46. Prp46 byl prvním odhaleným interakčním partnerem Prp45 identifikovaným pomocí dvouhybridního systému (Albers et al. 2003). Kromě uvedených komponent komplexu NTC N-koncová část Prp45 interaguje s proteinem Ecm2, což je také sestřihový faktor, který se podílí na vzniku helixu II mezi U2 a U6 snRNA (Xu & Friesen 2001). C-koncovou částí (aminokyselinami 169-379) Prp45 interaguje kromě proteinu Prp8 (viz výše) s U2 snRNA, s dalšími částmi Cef1 (NTC) a s komponentami komplexu RES Pml1, Ist3 a Bud13. Interakčním partnerem této oblasti je i protein Hsh155, což je sestřihový faktor asociovaný s U2 snRNP, který je důležitý pro interakci s místem větvení před vznikem spliceosomu B^{act} (Carrocci et al. 2018). Z uvedeného vyplývá, že Prp45 může sloužit jako platforma, která zprostředkovává interakce různých sestřihových subkomplexů. Jeho působení může přivádět tyto subkomplexy do fyzické blízkosti, může zvyšovat kooperativitu interakcí a podporovat vznik ternárních komplexů, nebo může naopak vázáním inhibujících komponent přispívat ke správnému fázování procesu sestavování spliceosomu.

Kromě alely *prp45*(1-169) jsme pro některé pokusy použili i nově připravené mutanty *prp45*(1-247) a *prp45*(1-330) (Obr. 23). Mutantě Prp(1-247) chybí interakční platforma pro všechny podjednotky komplexu RES a pro protein Hsh155, zatímco mutantě Prp45(1-330) chybí úplně část interagující s komponentou komplexu RES Ist3 a interakce s Hsh155 a s Prp8 může být oslabena. Při charakterizaci fenotypu těchto nově

vytvořených mutant jsme zjistili, že z hlediska růstu se obě chovají stejně jako divoké buňky, a to i při zvýšené kultivační teplotě (Obr. 24). Vliv na sestřih jsme analyzovali měřením hladin mRNA a pre-mRNA genů *ACT1* a *ECM33* pomocí qPCR (Obr. 25). Hladiny mRNA těchto genů byly u všech tří mutant Prp45 (tzn. *prp45*(1-169), *prp45*(1-247) a *prp45*(1-330)) stejné jako u divokých buněk. Co se týká hladin pre-mRNA, nejvyšší akumulace dosahovala mutanta *prp45*(1-169). Hladina pre-mRNA v ostatních mutantách byla také zvýšena, i když méně než v buňkách *prp45*(1-169). Buňky *prp45*(1-247) dosahovaly zhruba polovičního množství pre-mRNA oproti buňkám *prp45*(1-169) a míra akumulace pre-mRNA u buněk *prp45*(1-330) byla asi dvoutřetinová oproti buňkám *prp45*(1-169). Výraznějšího fenotypu z obou nových mutant dosahovaly buňky s delší formou proteinu (tedy Prp45(1-330)), což se neprojevovalo jen na úrovni akumulace pre-mRNA, ale i v dalších pokusech. Příčina není známa, ale je možné, že se buňky lépe vyrovnají se situací, kdy chybí interakční platforma pro celý komplex RES a protein Hsh155, jako je tomu u mutanty Prp45(1-247), než když jsou interakce RES a Hsh155 „jen“ dílčím způsobem postiženy, jako je tomu u mutanty Prp45(1-330).

6.2. Prp45 a sestřih pre-mRNA

Při charakterizaci buněk nesoucích mutaci *prp45*(1-169) jsme pomocí metody RNA-seq ukázali, že v těchto buňkách dochází k akumulaci pre-mRNA (Obr. 9a). Tří- až osminásobný nárůst hladiny pre-mRNA jsme u vybraných genů potvrdili také pomocí qPCR (Obr. 9c). Pokles hladin mRNA byl přitom v průměru pouze marginální (Obr. 9b, d).

Abychom zjistili, zda pozorovaná akumulace pre-mRNA není výsledkem poškození nějaké z degradačních drah specifických pro RNA, připravili jsme delece genů kódujících komponenty dráhy NMD, exosomu a cytoplazmatické 5' - 3' exonukleázy *XRNI* samostatně i v kombinaci s mutací *prp45*(1-169). U genu *ECM33*, u něhož degradace RNA nezávisí na některé výše zmíněné dráze (Sayani & Chanfreau 2012), nebyla pozorována zvýšená hladina pre-mRNA v kmenech se samostatnou delecí genů kódujících komponenty degradačních drah oproti divokým buňkám a dvojitá mutace nevedla k výraznější akumulaci pre-mRNA tohoto genu ve srovnání se situací u buněk *prp45*(1-169) (Obr. 10b). U genů *COF1*, *RPL22A* a *RPL22B*, jejichž odbourávání závisí na dráze NMD a *XRNI* (u *RPL22A* a *RPL22B*) (Sayani & Chanfreau 2012), vedla delece komponent této dráhy k nárůstu hladiny pre-mRNA (Obr. 10b). U odpovídajících dvojitých mutant byla hladina pre-mRNA u genů *COF1* a *RPL22A* vyšší, ale v rozsahu součtu efektů mutace *prp45*(1-169) a delece genu pro komponentu degradační dráhy. Hladina pre-mRNA genu *RPL22B*, který se ani v divokých buňkách prakticky nesestřihuje (Abrahamová et al. 2018; Gabunilas & Chanfreau 2016) a u buněk *prp45*(1-169) je jeho hladina zvýšena asi jen 1,3x, byla u jednoduchých deletant genů kódujících komponenty dráhy NMD a u buněk *xrn1Δ* podle očekávání zvýšena, ale mutace *prp45*(1-169) hladinu pre-mRNA už dále nenavýšovala. U výše studovaných genů se jednoduché i dvojitě alely projeví jen velmi malým poklesem hladin mRNA

(Obr. 10a). Buňky *prp45(1-169)* rovněž nevykazovaly změny v hladinách mRNA genů pro komponenty degradačních drah (výsledky RNA-seq; Tab 1).

U mutací některých sestřihových faktorů bylo pozorováno, že se projevují výrazněji při sestřihu genů obsahující nekánionické sekvence v sestřihových místech (Nissen et al. 2017; Neves et al. 2017). Pro snadnější stanovení rozsahu poškození sestřihu u jednotlivých genů s intronem z dat získaných metodou RNA-seq jsme v laboratoři vyvinuli metodu k identifikaci “readů” odpovídajících pre-mRNA a mRNA a k následnému výpočtu efektivit sestřihu (Převorovský et al. 2016). Porovnání efektivit sestřihu buněk *prp45(1-169)* však neukázalo rozdíly v efektivitě sestřihu genů s nekánionickým 5' sestřihovým místem ani místem větvení (Obr. 12a, b). Pro efektivní průběh sestřihu je také důležitá celková velikost intronu a hlavně vzdálenost mezi místem větvení a 3' sestřihovým místem. Nejdelší vzdálenost pro efektivní sestřih byla odhadnuta na ~45 nukleotidů (Meyer et al. 2011). Existuje však velký počet genů, které mají tuto vzdálenost delší. Příkladem může být gen *COF1*, u kterého tato vzdálenost dosahuje 132 nukleotidů. U takovýchto genů bylo ukázáno, že tato vzdálenost je efektivně zkrácena vytvořením sekundární struktury mezi místem větvení a 3' sestřihovým místem (Meyer et al. 2011; Gahura et al. 2011). Analyzovali jsme proto i možnost, zda sestřih intronů s dlouhou vzdáleností mezi místem větvení a 3' sestřihovým místem nezávisí na intaktním Prp45 více než sestřih intronů s kratší vzdáleností a nebo zda není postižen více sestřih intronů s celkově delším intronem. Ani zde jsme však žádnou závislost neodhalili (Obr. 12c, d).

Detekce zvýšené hladiny pre-mRNA v mutantách *prp45(1-169)* naznačuje, že tato mutace způsobuje defekt ještě před proběhnutím prvního kroku sestřihu, tedy v době formování spliceosomu. Vzhledem k tomu, že formování spliceosomu probíhá kotranskripčně a v blízkosti DNA, lze k detekci jednotlivých kroků vyvazování sestřihových faktorů využít metodu ChIP (viz kapitola 5.1.4.; (Kotovic et al. 2003; Görnemann et al. 2005)). Pomocí této metody jsme odhalili, že mutace v Prp45 vede ke zpožděnému vyvazování U2 snRNP a toto zpoždění se přenáší do dalších kroků sestavování spliceosomu, kdy dochází k prohloubení defektu při vyvazování komponent U5 snRNP (Brr2-HA). Kotranskripční vyvazování komplexu NTC je pak už téměř nedetekovatelné (Obr. 13).

6.2.1. Prp45 působí ještě před svojí stabilní inkorporací do spliceosomu

Z výsledků získaných metodou ChIP plyne, že protein Prp45 působí ve fázi formování spliceosomu, kdy komplex E (s navázanou U1 snRNP a heterodimerem Msl5/Mud2) přechází na komplex A, kdy dochází k uvolnění Msl5/Mud2 a oblast místa větvení je rozpoznávána U2 snRNP (viz Obr. 2). V tomto kroku Prp45 zřejmě ještě není stabilní součástí spliceosomu. Jeho společný výskyt s Msl5/Mud2 nebyl dosud zachycen, a to ani ve studiích, při kterých byly izolovány spliceosomální komplexy v určitých fázích a jejichž proteinové složení bylo identifikováno hmotnostní spektrometrií (Jurica et al. 2002; Makarov et al. 2002; Ohi et al. 2002; Fabrizio et al. 2009), ani v současných

studiích založených na kryoelektronové mikroskopii (Yan et al. 2015; Yan et al. 2016; Yan et al. 2017; Galej et al. 2016; Rauhut et al. 2016; Ruixue Wan et al. 2016; Bertram et al. 2017; Fica et al. 2017; Yan et al. 2019). V naší laboratoři byly dokumentovány případy dvouhybridní interakce mezi orthologem Prp45 z *S. pombe*, proteinem SNW1, a U2AF23, menší podjednotkou faktorů U2AF rozpoznávajících 3' sestřihové místo u metazoí (Ambrozková et al. 2001). Pomocí koimunoprecipitace byla rovněž zjištěna interakce lidského orthologa SKIP s lidským homologem proteinu Mud2, U2AF65 (Chen et al. 2011). Je možné, že v časných fázích sestavování spliceosomu dochází pouze k přechodným interakcím mezi Prp45 a danými komponentami, takže Prp45 nebyl při purifikacích spliceosomálních komplexů použitých pro analýzu hmotnostní spektrometrií nebo kryoelektronovou mikroskopií zachycen.

Zapojení sestřihových faktorů spojených s pozdějšími fázemi sestřihu do dřívějších kroků bylo u kvasinky *S. cerevisiae* v literatuře dokumentováno i pro další proteiny. Metabolická deplece proteinu Clf1, což je komponenta komplexu NTC, blokovala sestavování spliceosomu ve fázi prespliceosomu (tedy s navázanými partikulami U1 a U2 snRNP). K vyvázání U4/U6.U5 tri-snRNP už nedocházelo, i když byl v buňkách tento komplex zformován. Zajímavé také je, že Clf1 byl pomocí dvouhybridních pokusů identifikován jako interakční partner Mud2 a podjednotky U1 snRNP, Prp40 (Chung et al. 1999). I tento protein tedy působí dříve, než se komplex NTC, jehož je součástí, stabilně inkorporuje do spliceosomu. Dalším příkladem jsou proteiny Prp28 a Prp8. Prp28 je helikáza z rodiny DEAD, která katalyzuje izomerizaci RNA v oblasti 5' sestřihového místa, což vede k uvolnění U1 snRNP během formování komplexu B (Staley & Guthrie 1999). Prp8 je největší spliceosomální protein, který tvoří strukturní základ U5 snRNP (shrnutí v (Grainger & Beggs 2005)). Autoři nedávné studie ukázali, že alela *prp28-1* nejenže způsobovala blok v uvolnění U1 a U4 snRNP a redukovala stabilitu asociace U4/U6.U5 tri-snRNP, což bylo očekáváno, ale překvapivě také redukovala vyvazování Msl5 a Mud2; blokovala tedy vznik komplexu E. Tato redukce posléze ústila i ve zpožděném vyvazování U2 snRNP. Autoři také našli takové mutace v Prp8, které suprimovaly jak defekty ve vyvazování U4/U6.U5 tri-snRNP, tak defekty v kroku, ve kterém vzniká komplex E. Na základě těchto výsledků autoři postulovali, že protein Prp8 působí v rámci U5 snRNP v časných fázích sestavování spliceosomu, tedy ještě dříve, než je partikule U5 snRNP do spliceosomu stabilně inkorporována (Price et al. 2014).

6.2.2. Hypotézy vysvětlující opožděné vyvazování U2 snRNP

Pro vysvětlení, jakým způsobem Prp45 ovlivňuje sestavování spliceosomu v kroku vazby U2 snRNP, jsme navrhli několik hypotéz (pro přehlednost označených písmeny a až f). (a) Jednou z možností je ovlivnění funkce helikáz, které tento krok katalyzují. Tohoto kroku se účastní dvě helikázy, Sub2 a Prp5. Sub2 zprostředkuje uvolnění dimeru Msl5/Mud2 (Shen et al. 2008). Protože však disociace Msl5 a Mud2 probíhá u buněk *prp45(1-169)* s podobnou kinetikou jako u divokých buněk, krok

katalyzovaný Sub2 zřejmě mutace v Prp45 neovlivňuje. Představa funkce helikázy Prp5 je taková, že se Prp5 naváže na volnou U2 snRNP, kde katalyzuje přestavby ústící ve vznik takové konformace U2 snRNP, která umožňuje její vazbu na místo větvení a která ji udržuje v této konformaci (Perriman & Ares 2000; Perriman et al. 2003). Po vazbě U2 snRNP na místo větvení má Prp5 i kontrolní (“proofreading”) aktivitu, kontroluje párování mezi U2 snRNA a místem větvení. Pokud je párování vyhovující, je helikáza Prp5 uvolněna, U2 snRNP zůstává navázána na místě větvení a sestavování spliceosomu pokračuje do dalšího kroku. Pokud je párování “nevyhovující”, zůstane Prp5 navázána, což nakonec vede k aborci sestřihové reakce (Liang & Cheng 2015). Snížená kotranskripční vazba U2 snRNP u buněk *prp45(1-169)* tedy může naznačovat problémy Prp5 s uvedením U2 snRNP do konformace, která umožňuje její vazbu na místo větvení, nebo udržení U2 snRNP v této konformaci. Tyto okolnosti pak vedou k problémům U2 snRNP navázat se na místo větvení.

(b) Defekt ve vyvazování U2 snRNP a i působení Prp45 ještě dříve, než je stabilně inkorporován do spliceosomu, může také vysvětlit hypotéza, která na Prp45 nahlíží jako na sestřihový faktor, který má ještě další, dosud nerozpoznané funkce. Tyto funkce mohou souviset s rozpadem spliceosomu po proběhnutí sestřihové reakce a s recyklací spliceosomálních podjednotek. Je známo, že Prp45/SKIP je uvolněn spolu s vystřiženým intronem (Makarov et al. 2002). Zpožděné vyvazování U2 snRNP může být způsobeno tím, že vlivem defektu při rozpadu spliceosomu způsobeným mutací *prp45(1-169)* ještě U2 snRNP není pro opětovnou inkorporaci do spliceosomu plně k dispozici.

(c) Další z možností, kterou Prp45 může ovlivňovat kotranskripční vyvazování U2 snRNP, souvisí s chromatinovým prostředím a modifikacemi CTD RNA Pol II. Zajímavé je, že ve stejném kroku jako *prp45(1-169)* vykazují defekt v kotranskripčním sestavování spliceosomu i buňky *gcn5Δ* (viz kapitola 2.3.3.) (Gunderson & Johnson 2009). Na úrovni akumulace pre-mRNA však u buněk s dvojitou mutací *prp45(1-169) gcn5Δ* docházelo spíše k aditivnímu efektu (viz Obr. 18b), což by naznačovalo, že Prp45 ovlivňuje tento krok nezávisle na působení Gcn5. Měření hladin acetylace H3K9/18 u buněk s mutací *prp45(1-169)* provedené Mgr. L. Kovařovou v rámci její diplomové práce sice kvůli variabilitě měření v jednotlivých biologických replikátech neposkytlo úplně konkluzivní výsledky, ale na jejich základě jsme usoudili, že Prp45 nejspíše neovlivňuje acetylaci H3K9/18 (Kovařová, 2018).

(d) Jak je shrnuto v kapitole 2.3., i jiné modifikace chromatinu ovlivňují vyvazování spliceosomálních komponent. Mutace *htb1-K123R*, která zabráňuje ubiquitylaci H2BK123, ústila v nižší asociaci komponent U1 a U2 snRNP s některými vznikajícími transkripty (Hérissant et al. 2014). U buněk *prp45(1-169)* je však profil vyvazování U1 snRNP totožný s divokými buňkami, problém nastává až při vyvazování U2 snRNP. Výsledky získané s využitím alely *htb1-K123R* a s využitím *prp45(1-169)* byly dosaženy různými metodami, takže i když je působení Prp45 na vyvazování sestřihových komponent skrze ubiquitylaci H2BK123 méně pravděpodobné, vyloučit ho úplně nelze. Proti působení Prp45 skrze ubiquitylaci H2BK123 ovšem stojí i výsledky měření hladiny trimethylovaného H3K4, jehož vznik je na ubiquitylaci H2BK123 závislý (Sun & Allis 2002). Měření hladiny této modifikace metodou ChIP nenaznačilo, že by mutace *prp45(1-169)* tuto modifikaci ovlivňovala (L. Kovařová,

2018). Lze proto předpokládat, že ani ubiquitylace H2BK123 nebude v buňkách *prp45(1-169)* postižena.

(e) Histonová varianta H2A.Z byla rovněž ukázána jako důležitá pro kotranskripční sestavování spliceosomu, alespoň u některých genů. Delece genu *HTZ1*, který kóduje tuto histonovou variantu u *S. cerevisiae*, také ovlivňovala sestavování spliceosomu v kroku vyvazování U2 snRNP, přičemž vyvazování U1 snRNP nebylo oproti divokým buňkám změněno (Neves et al. 2017). U2 snRNP měla ovšem spíše tendenci se u buněk *htz1Δ* na testovaných genech s intronem akumulovat. Vzhledem k syntetické lethalitě mezi alelami *prp45(1-169)* a *htz1Δ* (viz dále) je možné, že pro správnou koordinaci vyvazování U2 snRNP je potřebná souhra mezi Prp45 a Htz1. Ačkoliv měření hladin pre-mRNA u buněk *prp45(1-247)* a *prp45(1-330)* zatím neposkytlo spolehlivé výsledky a na základě stávajících nelze jednoznačně říct, zda dochází k syntetické interakci mezi těmito alelami *PRP45* a *htz1Δ* na úrovni akumulace pre-mRNA, některá měření toto naznačují. Pro potvrzení bude ovšem nutné pokus opakovat.

(f) Výsledky studie z roku 2016 také ukázaly, že pro kotranskripční vyvazování spliceosomálních komponent je důležitá fosforylace CTD RNA Pol II na Ser5 (Harlen et al. 2016). Tato fosforylace je katalyzována kinázou Kin28, která je součástí obecného transkripčního faktoru TFIIF (Cismowski et al. 1995; Rodriguez et al. 2000) a která je kódována esenciálním genem obsahujícím intron. Z výsledků získaných metodou RNA-seq plyne, že u buněk *prp45(1-169)* je relativní efektivita sestřihu tohoto genu oproti divokým buňkám nižší, ale hladiny mRNA *KIN28* jsou sníženy jen v malém rozsahu, který je podobný ostatním genům obsahujícím intron. Výsledky Harlena a kolektivu také ukázaly, že fosforylace na Ser5 reguluje vyvazování U1 snRNP. Jeho profil vyvazování je však u buněk *prp45(1-169)* stejný jako u divokých buněk (Harlen et al. 2016). Defekty při sestavování spliceosomu u buněk *prp45(1-169)* tedy zřejmě nejsou způsobeny skrze aberace ve fosforylaci CTD RNA Pol II na Ser5.

6.2.3. Vyvazování a disociace U1 snRNP nejsou u buněk *prp45(1-169)* ovlivněny

Navzdory pozorovanému zpožděnému vyvazování U2 snRNP u buněk *prp45(1-169)* byl profil vyvazování a následné disociace Msl5, Mud2 a U1 snRNP stejný jako u divokých buněk (Obr. 13). Ačkoliv faktory Msl5 a Mud2 svojí vazbou předcházejí vazbě U2 snRNP, jejich disociace zřejmě není s vazbou U2 snRNP spojena. Termosenzitivní mutace faktoru Msl5 sice *in vitro* při nepermisivní teplotě blokovala vznik komplexu CC2 (tj. pre-mRNA s navázanou U1 snRNP a heterodimerem Msl5/Mud2), ale vznik pre-spliceosomu (tedy vyvázání U2 snRNP) blokován nebyl (Rutz & Séraphin 1999; Rutz & Séraphin 2000).

Zajímavější je situace týkající se U1 snRNP. V literatuře bylo ukázáno, že metabolická deplece U2 snRNP vedla k problémům s disociací U1 snRNP, jehož přítomnost tak byla metodou chromatinové imunoprecipitace detekovatelná i v oblasti exonu 2 (Tardiff & Rosbash 2006). Vzhledem k tomu, že mutace *prp45(1-169)* způsobuje

zpoždění ve vyvazování U2 snRNP, byla by také očekávatelná přetrvávající přítomnost U1 snRNP i v oblasti exonu 2, což však pozorováno nebylo. Lze tedy hypotetizovat, že mutace *prp45(1-169)* způsobuje odpřažení disociace U1 snRNP od návazné vazby dalších sestřihových komponent.

6.2.4. Sestřih v buňkách *prp45(1-169)* probíhá posttranskripčně

Buňky *prp45(1-169)* akumulují pre-mRNA. Akumulace pre-mRNA může být souhrou působení několika okolností. Vzhledem k tomu, že hladiny mRNA jsou u buněk *prp45(1-169)* sníženy jen mírně, usuzujeme, že sestřih nakonec proběhne, ale posttranskripčně. Posttranskripční sestřih může být méně účinný než kotranskripční sestřih, protože je například odpřažena pomoc chromatinového prostředí nebo CTD RNA Pol II při vyvazování sestřihových komponent. Kvůli opožděnému sestřihu je tedy pre-mRNA v buňkách déle a tím pádem je zachytitelná experimentálně. Výsledky získané s využitím reportérového systému detekujícího sestřih a export pre-mRNA z jádra ukázaly, že část nesestřižené pre-mRNA také uniká do cytoplasmy (Hálová et al. 2017), kde už není pro sestřih přístupná vůbec, což jen přispívá k pozorovanému fenotypu akumulace pre-mRNA. Stejný fenotyp byl pozorován pro delece genů kódujících podjednotky komplexu RES (odtud jeho název - “Retention and splicing”) (Dziembowski et al. 2004). Podjednotky komplexu RES jsou v přímé fyzické interakci s Prp45 a mutace *prp45(1-169)* vede ke ztrátě této interakce. Komplex RES proto může být se spliceosomem v mutovaných buňkách vázán slaběji, což ústí ve zvýšený únik pre-mRNA, která je v buňkách přítomna vzhledem k hůře fungujícímu sestřihu, ven z jádra.

Zajímavé výsledky týkající se posttranskripčního sestřihu byly publikovány v roce 2016 a týkají se fosforylace CTD RNA Pol II na Thr4. Nahrazení všech 26 Thr na pozici 4 v rámci CTD RNA Pol II nefosforylovatelným valinem neovlivňovalo kotranskripční vyvazování U1 ani U2 snRNP a kotranskripční sestřih, ale docházelo k akumulaci pre-mRNA. Autoři z těchto výsledků vyvodili, že fosforylace Thr4 je důležitá pro průběh posttranskripčního sestřihu (Harlen et al. 2016). Zajímavé by bylo zjistit, jak zabránění fosforylace Thr4 ovlivní sestřih u buněk s mutací *prp45(1-169)*. Kináza fosforylující tento zbytek ještě nebyla identifikována, ale existují dva kandidáti. U kuřecích a savčích buněk bylo ukázáno, že inhibice CDK9 vedla ke snížení hladiny fosforylace na Thr4 (Hsin et al. 2011; Hsin et al. 2014). CDK9 je kináza, která je součástí P-TEFb, jehož kvasinkové homology jsou kinázy Bur1 a Ctk1. Druhými kandidáty, také nalezenými u savců, jsou Polo-like kinázy Plk3 a Plk1 (Hintermair et al. 2012; Hintermair et al. 2016). Kvasinkový homolog těchto kináz je Cdc5. Geny kódující kinázy Bur1 a Cdc5 jsou esenciální, takže genetická interakce jejich delečních alel a *prp45(1-169)* nemohla být testována. Odhalili jsme však negativní genetickou interakci mezi *prp45(1-169)* a delecí genu kódujícího cyklin kinázy Bur1, *BUR2* (Obr. 15). Měření hladiny pre-mRNA u dvojitých mutant *prp45(1-169) bur2Δ* ve srovnání s buňkami s jednoduchou mutací *prp45(1-169)* žádnou změnu neodhalilo (ale u samostatné delece

genu *BUR2* ano, viz dále) (Obr. 18b). Otázkou však zůstává, zda pro fosforylaci CTD RNA Pol II na Thr4 není potřeba souhra všech zmíněných kináz a zda tyto kinázy jsou u kvasinky (a nakonec i u savců) za tuto fosforylaci vůbec odpovědné.

6.3. Prp45 a transkripce

6.3.1. Genetické interakce a interakce na úrovni indukce *PHO5*

Zapojení proteinů SNW do procesů souvisejících s elongací transkripce a s modifikacemi chromatinu bylo zatím v literatuře spojeno převážně s lidským orthologem, proteinem SKIP (viz kap. 2.4.1.). Výsledky získané v naší laboratoři však ukazují, že i Prp45 z kvasinky *S. cerevisiae* participuje na regulaci těchto procesů.

Prvotní výsledky spojující Prp45 s transkripcí se týkaly genů *PHO*, u kterých byla pozorována zpožděná indukce u buněk *prp45(1-169)* (K. Abrhánová, nepublikované výsledky, M. Hálová, 2011). Na tomto výsledku je zajímavé to, že geny *PHO* ani další geny kódující proteiny regulující fosfátový metabolismus neobsahují intron, s jedinou výjimkou, kterou je gen *PHO85*. *PHO85* kóduje cyklin-dependentní kinázu, která za podmínek dostatku fosfátu v buňce fosforyluje transkripční faktor Pho4 (Kaffman et al. 1994), který reguluje expresi většiny genů zprostředkovávajících příjem fosfátu, včetně *PHO5* (Ogawa & Oshima 1990). Fosforylace zabraňuje vstupu Pho4 do jádra, usnadňuje jeho export z jádra a zabraňuje interakci s dalším transkripčním faktorem odpovědným za indukci genů *PHO*, Pho2 (Kaffman, Rank, O'Neill, et al. 1998; Kaffman, Rank & O'Shea 1998; Komeili & O'Shea 1999). Toto vše vede k zabránění exprese genů *PHO*. Bylo pozorováno, že delece genu *PHO85* ústila v konstitutivní expresi genů dráhy *PHO* (Huang et al. 2002). Defekt v sestřihu genu *PHO85* u buněk *prp45(1-169)* by tedy spíše ústil v derepresi genu *PHO5* za neindukčních podmínek a k rychlejší indukci za indukčních podmínek, což z našich výsledků nevyplývá. Data získaná metodou RNA-seq navíc defekt v sestřihu genu *PHO85* u buněk *prp45(1-169)* neukázala. Máme tedy za to, že defekt v indukci genů *PHO* je způsoben ovlivněním transkripční mašinerie, i když nepřímý efekt vlivem špatného sestřihu nějakého transkripčního regulátoru nelze úplně vyloučit.

Z literatury jsou známy geny, které kódují proteiny související s regulací transkripce a modifikacemi chromatinu, jejichž delece ovlivňují expresi genů *PHO* (Carvin & Kladde 2004). Nejprve jsme se rozhodli otestovat genetické interakce mezi alelou *prp45(1-169)* a delečními alelami těchto genů na úrovni růstu. Navíc jsme zahrnuli i některé další geny, které nebyly v publikaci Carvina a Kladdeho testovány, ale s výše zmíněnými faktory funkčně souvisejí. Výsledky ukázaly, že na úrovni růstu alela *prp45(1-169)* s mnohými těmito faktory interagovala negativně i pozitivně (Obr. 15). Existuje však i početná skupina faktorů, se kterými žádná interakce pozorována nebyla, například s geny pro histonmethyltransferázy Set2 a Dot1, které methylují histon H3 na lysinu 36 respektive histon H3 na lysinu 79, nebo s genem pro remodelátor chromatinu

Chd1. To naznačuje, že efekt *prp45*(1-169) na regulaci transkripce je specifický jen pro některé její aspekty.

S vybranými deletantami genů, které na úrovni růstu vykazují genetickou interakci s *prp45*(1-169), jsme testovali genetické interakce i na úrovni indukce genu *PHO5* (Obr. 17). Pro testování jsme vybrali deleční alelu genu *BUR2* jakožto zástupce komplexu Bur1/Bur2 regulujícího fosforylaci CTD RNA Pol II na Ser2 v časných fázích elongace transkripce, který je důležitý pro regulaci dalších procesů v rámci elongace (viz kapitola 2.2.2.1. Literárního úvodu) (Liu et al. 2009; Qiu et al. 2009). Dále deleční alelu genu *PAF1* kódujícího komponentu komplexu Paf, deleční alelu genu *RAD6* kódujícího enzym E2 pro několik enzymů E3 ubiquitinytujících různé cíle, deleční alelu genu kódujícího deubiquitinylační enzym pro H2BK123 *UBP8* a deleční alelu genu *SET1* kódujícího histonmethyltransferázu specifickou pro H3K4. O genetické interakci s delečními alelami faktorů *BUR2* a *PAF1* na úrovni indukce genu *PHO5* nebylo možné na základě pokusu, tak jak byl proveden, rozhodnout, i když tendence pro genetickou interakci mezi *prp45*(1-169) a *bur2Δ* byla patrná. Pro potvrzení by bylo nutné sledovat indukci genu *PHO5* v delších časových intervalech po přenosu buněk do indukčních podmínek. Otestovat interakci mezi *prp45*(1-169) a *bur2Δ* blíže by bylo zajímavé zvláště z toho hlediska, že stejně jako u akumulace pre-mRNA je i v případě zpožděné indukce genu *PHO5* zajímavá shoda fenotypu u buněk *prp45*(1-169) s buňkami se záměnou Thr4 v rámci CTD RNA Pol II za valin (Rosonina et al. 2014; Harlen et al. 2016). Jak bylo poznamenáno výše, tato záměna znemožňuje fosforylaci CTD na pozici 4 a mezi kandidáty na kinázu tohoto zbytku je i homolog lidského P-TEFb (Hsin et al. 2011; Hsin et al. 2014), kterým je i kináza Bur1. Lze tedy spekulovat, že zpožděná indukce genů *PHO* u mutanty *prp45*(1-169) je způsobena změnami v hladině fosforylace Thr4 CTD RNA Pol II.

Ačkoliv mutace *prp45*(1-169) vykazovala na úrovni růstu pozitivní genetickou interakci s *ubp8Δ*, na úrovni indukce *PHO5* se tento efekt nerekapituloval. U alel *prp45*(1-169) a *set1Δ* byl odhalen epistatický vztah. Negativní genetická interakce na úrovni indukce genu *PHO5* byla ukázána jen mezi alelami *prp45*(1-169) a *rad6Δ*. Jak už bylo poznamenáno výše, Rad6 slouží jako enzym E2 pro více enzymů E3, které ubiquitinylují různé cíle. Máme za to, že vliv na kinetiku indukce genu *PHO5* u buněk *rad6Δ* i u dvojitých mutantů *prp45*(1-169) *rad6Δ* je zprostředkován skrze enzym E3 Bre1, který ubiquitinyluje histon H2B na lysinu 123 ((Robzyk et al. 2000; Hwang et al. 2003; Wood, Krogan, et al. 2003); viz kapitola 2.2.2.1. Literárního úvodu). Ačkoliv genetická interakce mezi *prp45*(1-169) a *bre1Δ* není na úrovni růstu silná (Obr. 15), genetická interakce mezi *prp45*(1-169) a deleční alelou genu *LGE1*, který se ubiquitinyluje H2BK123 také účastní (Hwang et al. 2003), je patrná. Navíc spojitost mezi indukcí genu *PHO5* a Bre1 byla publikována v článku Carvina a Kladdeho (Carvin & Kladde 2004). Ačkoliv si nemyslíme, že efekt zpožděného vyvazování sestříhových komponent u buněk *prp45*(1-169) je zapříčiněn změnami v ubiquitinylaci H2BK123 (viz kapitola 6.2.2. Diskuse), je možné, že na úrovni kinetiky indukce genu *PHO5* k nějaké kooperaci mezi ubiquitinylací H2BK123 a Prp45 dochází. Jakou povahu má tato kooperace, však zůstává otázkou. Vzhledem k tomu, že hladina trimethylace H3K4, jejíž vznik závisí na ubiquitinylaci H2BK123 (Sun & Allis 2002), pravděpodobně u buněk *prp45*(1-169)

změněna není (L. Kovařová, 2018, kapitola 6.2.2.. Diskuse), vliv *prp45(1-169)* na kinetiku indukce *PHO5* se zřejmě nemanifestuje skrze samotný vznik ubiquitinylace H2BK123. Tato modifikace je však důležitá i pro přestavby chromatinové struktury, které mají za cíl zabránit iniciaci transkripce z kryptických aktivačních sekvencí (viz kapitola 2.2.2.1. Literárního úvodu). Tyto kryptické transkripty, často vznikající v “antisense” orientaci, mohou ovlivňovat transkripci v “sense” směru, a to negativně i pozitivně, což bylo pozorováno například pro geny *PHO84* nebo *ARG1* (Camblong et al. 2007; Crisucci & Arndt 2012). U genu *PHO5* byla také prokázána existence “antisense” transkriptu, který ovlivňoval jeho expresi v “sense” směru. Znemožnění této “antisense” transkripce vedlo k problémům při indukci genu *PHO5*, což by naznačovalo, že “antisense” transkript reguluje expresi *PHO5* pozitivně (Uhler et al. 2007). Přesný mechanismus funkce “antisense” transkriptu genu *PHO5* však nebyl plně objasněn. Ačkoliv jsem v rámci své diplomové práce měřila hladiny “antisense” transkriptu genu *PHO5* jak v represivních tak indukčních podmínkách (M. Hálová, 2011), měření z 60. minuty po indukci, kdy byl pozorován rozdíl v hladině *PHO5* u divokých buněk ve srovnání s buňkami *prp45(1-169)*, nebylo konkluzivní. Otázka, zda *prp45(1-169)* neovlivňuje kinetiku indukce genu *PHO5* skrze “antisense” transkripci, která může záviset na procesech probíhajících “downstream” od ubiquitinylace H2BK123, tedy stále nemá jednoznačnou odpověď.

6.3.2. Dereprese genu *PHO5* v neindukčních podmínkách

Původní nález spojující expresi genu *PHO5* s regulátory elongace transkripce a modifikátory chromatinu byl ten, že delece genů *SET1*, *PAF1*, *RTF1*, *RAD6*, *BRE1* a *LGE1* vedly ke derepresi genu *PHO5* v neindukčních (nebo semiindukčních) podmínkách (Carvin & Kladde 2004). V našich pokusech jsme derepresi genu *PHO5* v neindukčních podmínkách pozorovali u buněk *bur2Δ* (samostatně i v kombinaci s mutací *prp45(1-169)*), v experimentech provedených v rámci mé diplomové práce u alely *paf1Δ* (v rámci jednoduché i dvojité mutace) a v pokusech provedených v rámci mého postgraduálního studia i u buněk *set1Δ* (a u dvojité mutanty). U buněk *rad6Δ* tento fenotyp pozorován nebyl. Možnou příčinou diskrepance je to, že v původním článku byla měřena dereprese genu *PHO5* na proteinové úrovni pomocí enzymatické eseje (*PHO5* kóduje kyselou fosfatázu), zatímco my jsme měřili hladinu *PHO5* na úrovni cDNA vzniklé přepisem z celkové izolované RNA. Výstup experimentů proto může být odlišný. Hlavní odlišností ale je to, že autoři citované publikace použili buňky s jiným genetickým pozadím, než jsme použili my v našich pokusech. Ačkoliv v obou pokusech bylo pracováno s kvasinkami *S. cerevisiae*, známým faktem je, že se jednotlivé laboratorní kmeny liší malými, ale relativně častými mutacemi (Schacherer et al. 2007; Winzeler et al. 2003). Vzhledem k tomu, že většina fenotypů je spíše kvantitativní povahy, a tedy závislá na působení více genů, mají i tyto malé rozdíly poměrně silný vliv na výsledný fenotyp buněk (Steinmetz et al. 2002; Yvert et al. 2003; Deutschbauer & Davis 2005). O genetickém pozadí kmenů BY4741 a BY4742 je známo, že má na fenotyp našich buněk poměrně velký efekt. Například termosenzitivita způsobená alelou *prp45(1-169)*

se u buněk tohoto genetického pozadí projevuje při 39 °C, zatímco u buněk genetického pozadí EGY48 už při 37 °C.

Na základě pokusů Carvina a Kladdeho je vidět, že jednotlivé delece výše zmíněných faktorů vedou k různému rozsahu dereprese genu *PHO5*. Nejsilnější efekt se projevil u buněk s delecí genu *PAF1*, efekt ostatních delecí byl slabší. Autoři vyvodili, že síla fenotypu souvisí s tím, že při regulaci elongace transkripce protein Paf1 působí “upstream” od působení enzymů Rad6/Bre1/Lge1 zprostředkovávajících ubiquitinylation H2BK123 a od Set1 zprostředkovávajícího metylaci H3K4 (Carvin & Kladde 2004). V případě našich pokusů byla pozorována nejsilnější dereprese u buněk *bur2Δ* (a u příslušné dvojité mutanty). V původní publikaci tato delece testována nebyla, jde o náš původní nález. Vzhledem k tomu, že Bur2 působí při regulaci elongace transkripce ještě víc “upstream” než Paf1 (viz kapitola 2.2.2.1. Literárního úvodu), lze očekávat, že výsledná dereprese genu *PHO5* bude ještě vyšší než u buněk *paf1Δ*. Tento předpoklad se potvrdil, u pokusů provedených v rámci mé diplomové práce bylo u buněk s mutací *bur2Δ* pozorováno 6 - 8násobné nabohacení transkriptu *PHO5* než u divokých buněk, hladina tohoto transkriptu u buněk *paf1Δ* byla pak 3,5x vyšší oproti divokým buňkám. Pokud by i v našich pokusech byl zachován poměr míry dereprese genu *PHO5* u mutant *paf1Δ* vůči *rad6Δ* jako v pokusech Carvina a Kladdeho, měla by být při našich pokusech pozorována zhruba dvojnásobná dereprese *PHO5* i u buněk *rad6Δ*. U těchto buněk jsme však derepresi nepozorovali. Je pravděpodobné, že v genetickém pozadí BY4741/BY4742 nelze stejný poměr očekávat, dereprese genu *PHO5* může být u buněk v tomto genetickém pozadí nedetekovatelná. V případě pokusů provedených v rámci mé disertační práce byla také pozorována nejvyšší hladina genu *PHO5* v neindukčních podmínkách u mutant s delecí *BUR2*, zde to ale bylo jen ve 2-3násobném rozsahu. Příčina rozdílu ve výsledcích získaných v rámci diplomové a disertační práce není jasná, o tom, zda to může být způsobeno odlišnou šarží média, lze jen spekulovat. Každopádně vzhledem k takto malému rozsahu dereprese u mutanty, která má z tohoto hlediska nejsilnější fenotyp, lze očekávat, že se dereprese u kmenů *paf1Δ* a *rad6Δ* neprojeví.

6.3.3. Alela *prp45*(1-169), deleční alely genů souvisejících s transkripcí a modifikacemi chromatinu a sestřih pre-mRNA

Změřit hladiny mRNA a pre-mRNA jsme se rozhodli také u buněk s delecemi vybraného panelu genů, jejichž proteinové produkty mají vztah k elongaci transkripce a modifikacím chromatinu a u buněk s dvojitou mutací (Obr. 18). K testování jsme na základě výsledků získaných metodou “primer extension” vybrali čtyři geny: *ECM33* a *ACT1* jako představitele dobře se sestřihujících genů v buňkách s mutací *prp45*(1-169) a *COF1* a *MAF1* jako představitele špatně se sestřihujících genů u mutant *prp45*(1-169) (v té době jsme ještě neměli k dispozici výsledky získané metodou RNA-seq). Gen *COF1* obsahuje intron s neobvykle dlouhou vzdáleností mezi místem větvení a 3' sestřihovým místem. Pro efektivní sestřih tohoto genu je nutné tuto vzdálenost zkrátit, což je zprostředkováno vznikem vlásenky mezi místem větvení a 3' sestřihovým místem

(Gahura et al. 2011). Je možné, že z tohoto důvodu závisí sestřih genu *COF1* na Prp45 více než u ostatních genů. Je však zajímavé, že výsledky provedené pomocí qPCR neodhalily tak velký pokles mRNA genu *COF1* jako u výsledků získaných metodou “primer extension”. Může to být dáno tím, že při použití metody “primer extension” je měřen sestřih genu *COF1* v rámci rekombinantního substrátu, což může výsledky ovlivnit. Naproti tomu zhoršený sestřih genu *MAF1* projevující se sníženou hladinou mRNA u buněk *prp45(1-169)* byl metodou qPCR pozorován také. Jaká vlastnost intronu *MAF1* způsobuje jeho zhoršený sestřih v buňkách *prp45(1-169)*, však zůstává otázkou.

Ve většině případů samostatná delece jednoho z genů pro regulátory transkripce nebo modifikátory chromatinu neměnila hladinu pre-mRNA oproti divokým buňkám (Obr. 18b). Byly zde však dvě výjimky. Tou první byly buňky s delecí genu *GCN5* a tou druhou buňky s delecí genu *BUR2*, u kterých hladiny pre-mRNA dosahovaly 1,5 až 3-násobku hladiny v divokých buňkách. Spojitost histonacetyltransferázy Gcn5 se sestřihem už byla v literatuře dokumentována a bylo ukázáno, že její delece vede k akumulaci pre-mRNA (Gunderson & Johnson 2009; Gunderson et al. 2011). U dvojité mutace poté došlo k aditivnímu efektu, což naznačuje, že Prp45 a Gcn5 působí na sestřih odlišným způsobem. Gen *BUR2* kóduje cyklin pro cyklin-dependentní kinázu Bur1, která fosforyluje CTD RNA Pol II na Ser2 v časných fázích elongace transkripce (Murray et al. 2001; Liu et al. 2009; Qiu et al. 2009). U savčích buněk bylo ukázáno, že fosforylovaná forma CTD RNA Pol II, ale ne forma bez fosforylace, stimulovala sestřih (David et al. 2011). Fosforylovaná forma CTD RNA Pol II také interagovala s U2AF65 (lidský homolog Mud2), který také interagoval s komplexem NTC (David et al. 2011). Ačkoliv o tom, o jakou přesně fosforylaci CTD RNA Pol II se jedná, a tedy ani o identitu kinázy nutné pro tuto fosforylaci, nebyla ve zmíněných pracích zmínka, je možné, že nějakou úlohu v tomto smyslu může mít i komplex Bur1/Bur2. Mírná akumulace pre-mRNA u buněk s delecí genu *BUR2* by tímto mohla být (alespoň zčásti) vysvětlena. Z tohoto hlediska by bylo zajímavé spekulovat, že by mohlo jít o fosforylaci na Thr4, u které také byla pozorována akumulace pre-mRNA (viz výše) (Harlen et al. 2016) a Bur1 je, jako homolog kinázy CDK9, jedním z kandidátů na kinázu katalyzující tuto fosforylaci (Hsin et al. 2011; Hsin et al. 2014). Je však zajímavé, že u buněk s dvojitou mutací *prp45(1-169) bur2Δ* nedocházelo k aditivnímu efektu, hladina pre-mRNA byla na stejné úrovni jako u buněk *prp45(1-169)*. Tento efekt by mohl naznačovat nějakou funkční souvislost mezi Bur2 a Prp45 (a případně fosforylací na Thr4 CTD RNA Pol II). Pro rozhodnutí, zda je mezi Bur2 a Prp45 opravdu nějaký funkční vztah, by ovšem bylo potřeba provést další experimenty.

Hladiny mRNA byly u jednoduchých mutant podobné divokým buňkám (Obr. 18a). Výjimkou byla měření provedená na genu *MAF1*, kde byla hladina u dvojitých mutant snížena zhruba ve stejném rozsahu jako u mutant *prp45(1-169)*. Výraznou výjimkou byla také hladina mRNA genu *MAF1* u buněk *gcn5Δ*, u kterých byla tato hladina oproti divokým buňkám 2x zvýšena. Vzhledem ke známému efektu Gcn5 na sestřih (viz výše) by bylo spíše očekáváno, že delece tohoto genu povede ke snížení hladiny mRNA. Navýšení je tedy překvapující a jeho důvod není jasný.

6.3.4. SGA a genetické interakce mezi alelami *prp45* a *htz1Δ*

Pro rozšíření testování genetických interakcí u buněk *prp45*(1-169) na celogenomovou úroveň jsme využili metodu SGA. Zhruba z 6000 testovaných genů jsme genetickou interakci našli se 183 delečními alelami. Významná skupina, asi 30 % všech nalezených interaktorů, souvisí s regulací transkripce a organizací chromatinu (Obr. 20). V tomto panelu byly nejvýznamněji zastoupeny komplexy regulující acetylaci a deacetylaci chromatinu. Z acetylačních komplexů je to NuA4 a z deacetylačních komplexů Set3, Rpd3-L, Rpd3-S, HDAC a deacetylační modul komplexu SAGA. Z dalších komplexů katalyzujících modifikace chromatinu to byl histonmethyltransferázový komplex COMPASS a deubiquitinylační modul komplexu SAGA, který deubiquitinyluje H2BK123. Dále byly zastoupeny komponenty komplexů účastnících se elongace transkripce. Mezi tyto komplexy patří FACT, THO, PAF a prefoldinový komplex.

Nejsilnější genetické interakce však byly nalezeny s deleční alelou genu *HTZ1*, který kóduje histonovou variantu H2A.Z (viz kapitola 2.2.3. Literárního úvodu), a komponentami komplexu SWR1, který je odpovědný za inkorporaci H2A.Z do chromatinu. S alelou *htz1Δ* je alela *prp45*(1-169) dokonce ve vztahu syntetické lethality. Mnoho genetických interaktorů, i když ne úplně těch nejsilnějších, bylo nalezeno i s delečními alelami genů kódujících komponenty komplexu INO80, který se podílí na odstraňování H2A.Z z chromatinu (viz kapitola 2.2.3. Literárního úvodu). Genetické interakce mezi *prp45*(1-169), *htz1Δ* a delečními alelami genů kódujících komponenty komplexu SWR1 byly také ověřeny nezávisle v kvasinkovém kmeni jiného genetického pozadí, než byl použit pro SGA (Obr. 21).

Autoři článků spojujících *Htz1* se sestřihem ukázali, že delece genu *HTZ1* je synteticky lethální s delecemi komponent U2 snRNP *MSL1* a *LEA1*, ale s delecemi genů kódujících jiné komponenty spliceosomu, včetně komplexu NTC, syntetická interakce stupně lethality nedosahuje (Nissen et al. 2017). Tento nález je v souladu s naším zjištěním, že defekt v sestavování spliceosomu způsobený mutací *prp45*(1-169) začíná v kroku vyvazování U2 snRNP (Obr. 13). Autoři článku také pozorovali, že delece *HTZ1* způsobuje problémy při sestřihu genů, které obsahují nekánonické sestřihové sekvence, i když podle našeho názoru je tento defekt velmi malý. Tento defekt byl pozorován i u kvasinky *S. pombe* (Neves et al. 2017). Analýza efektivity sestřihu genů nalezených autory Nevesem a kolektivem s využitím dat získaných metodou RNA-seq však u mutant *prp45*(1-169) neodhalila prohloubení defektu v sestřihu těchto genů ve srovnání s ostatními geny s intronem (Obr. 22). To je v souladu se zjištěním (jak už bylo poznamenáno výše), že ani u jiných genů s nekánonickým 5' sestřihovým místem nebo místem větvení nebylo pozorováno prohloubení defektu v sestřihu u mutant *prp45*(1-169) ve srovnání s geny s kánonickými sestřihovými místy (Obr. 12). Přes pozorovanou syntetickou lethality mezi *prp45*(1-169) a *htz1Δ* nebylo pozorováno ani zhoršení efektivity sestřihu u mutant *prp45*(1-169) u genů s intronem, v jejichž promotoru nebo otevřeném čtecím rámci byla na základě dat získaných metodou ChIP-seq (Gu et al. 2015) identifikována histonová varianta H2A.Z (Obr. 22).

I když dosavadní analýzy *in silico* neodhalily žádnou souvislost mezi Prp45 a Htz1 na úrovni sestřihu, vzhledem k velmi silné negativní genetické interakci mezi *prp45(1-169)* a *htz1Δ* jsme přesto jejich funkční souvislost chtěli analyzovat blíže. Protože buňky *prp45(1-169) htz1Δ* nejsou viabilní, rozhodli jsme se využít mutanty *prp45(1-247)* a *prp45(1-330)*, u kterých jsme pomocí kapkového testu také odhalili negativní genetickou interakci s *htz1Δ* (Obr. 27). Nejvýrazněji se růstový defekt projevil v 16 °C a s mutantou *prp45(1-330)* byl silnější než s mutantou *prp45(1-247)*. Zajímavé také bylo, že se síla genetické interakce mezi čtyřmi testovanými tetradami od každé kombinace lišila. Máme za to, že tento rozdíl je způsoben mírně odlišnou kombinací alel, která vznikla během meiotického dělení a která ústí v mírně odlišné genetické pozadí každého takto připraveného kmene (viz výše). Z tohoto hlediska byly testovatelné vlivy auxotrofií na lysin a methionin a párovací typ. Analýza však neodhalila žádný vzorec v těchto kombinacích, který by koreloval se silnější genetickou interakcí u dvojité mutanty. Za tento efekt je tedy nejspíše odpovědná suma malých odlišností, které lze experimentálně postihnout jen nesnadno. Měření hladiny mRNA a pre-mRNA u dvojitých mutant bohužel zatím neposkytlo kvůli nereproducibilitě mezi jednotlivými biologickými pokusy konkluzivní výsledky. Zatím lze pouze uzavřít, že hladina mRNA se nejeví u mutant oproti divokým buňkám ve většině případů postižena a hladina pre-mRNA je ve většině případů u buněk *prp45(1-247) htz1Δ* na podobné úrovni jako u buněk *prp45(1-247)*. U buněk *prp45(1-330) htz1Δ* je hladina pre-mRNA ve většině případů mírně vyšší než u buněk *prp45(1-330)*, ale skutečný rozsah tohoto navýšení, který by napovídal o síle genetické interakce, pokud skutečně nějaká existuje, nelze z naměřených výsledků zatím jednoznačně vyvodit. Nutné je ještě poznamenat, že naměřené množství pre-mRNA nekoreluje se silou interakce pozorovanou na úrovni růstu kapkovým testem v rámci čtyř testovaných tetrad.

Z hlediska silné negativní genetické interakce mezi *prp45(1-169)* a delečními alelami komponent komplexů souvisejících s dynamikou histonové varianty H2A.Z je zajímavé také pozorování, že při testování pomocí SGA byly alely *htz1Δ* a deleční alely komponent komplexů SWR1 a INO80 také odhaleny jako nejsilnější interaktoři mutace, ve které byly všechny Thr4 CTD RNA Pol II nahrazeny za nefosforylovatelný valin (Rosonina et al. 2014). Vzhledem k tomu, že efekty mutace *prp45(1-169)* kopírují efekty této záměny na úrovni akumulace pre-mRNA, zpožděné indukce genů *PHO* i na úrovni genetických interakcí, bude zajímavé v rámci dalších pokusů zjistit, zda spolu fosforylace CTD RNA Pol II na Thr4 a protein Prp45 funkčně souvisejí a jaký je mechanismus této kooperace.

6.4. Spřahuje Prp45 sestřih s transkripcí?

O proteinu SKIP bylo získáno mnoho poznatků, které ukazují na jeho zapojení jak při sestřihu pre-mRNA, tak při transkripci, a to na úrovni iniciace i elongace. Některé výsledky pojí jeho fungování i s modifikacemi chromatinu. Z těchto důvodů je na SKIP nahlíženo jako na jeden z faktorů, které mohou tyto procesy, probíhající ve stejném čase a na stejném místě, spřahovat. Kvasinkový ortholog SKIP, Prp45, byl studován

především v souvislosti se sestřihem. V naší laboratoři a v rámci této práce jsme získali výsledky, které naznačují jeho působení i v širším kontextu a které nelze vysvětlit jenom v rámci jeho role ve spliceosomu. Situace Prp45 navíc není pouhou kopií situace SKIP v savčích buňkách, protože některé z metazoálních partnerů SKIP v kvasince nejsou přítomny, sestřihový aparát je redukován a jednodušší je i situace v posttranslačních modifikacích chromatinu. Přesto nebo právě proto by mohlo poznání mechanismu fungování Prp45 poskytnout informace o evolučně původních souvislostech mezi procesy transkripce a sestřihu.

V této kapitole bych chtěla získané výsledky ještě jednou stručně shrnout a nastínit hypotézy, podle kterých by Prp45 mohl v souvislosti s propojením transkripce, sestřihu a v závislosti na chromatinovém prostředí fungovat.

6.4.1. Výsledky - rekapitulace

V souvislosti s regulací sestřihu je první zvláštností fungování Prp45 jeho zapojení ve vyvazování U2 snRNP, tedy v kroku, kdy ještě nebyl biochemickými metodami a kryoelektronovou mikroskopií zachycen jako součást spliceosomu. Tento efekt byl pozorován i pro jiné spliceosomální proteiny, nicméně jakým způsobem je toto působení zprostředkováno, ještě stále není vysvětleno. Nejnovější práce o strukturách stadií spliceosomu ukazují, že ani v komplexu pre-B ani v B (Charenton et al. 2019) není Prp45/SKIP detekovatelný. To nelze vysvětlit jinak, než že se v těchto stádiích nachází ještě mimo pevně asociující „core“, které je izolovatelné biochemicky a posléze detekovatelné kryoelektronovou mikroskopií. Jedním z možných vysvětlení je, že Prp45 je součástí pouze subpopulace spliceosomálních partikulí, které jsou minoritní nebo nejsou dostatečně stabilní, a tudíž nejsou zastoupeny v souborech selektovaných pro analýzy. Tato subpopulace by nicméně mohla ovlivňovat celkovou rovnováhu faktorů v rámci procesu sestavování spliceosomu. Další možností je, že Prp45 ovlivňuje ranná stadia sestavování spliceosomu nepřímou tím, že mění mikroprostředí, ve kterém asociace probíhá, nebo tím, že reguluje dostupnost a vlastnosti snRNP (viz hypotézy níže).

Na zapojení Prp45 při transkripci ukazuje několik výsledků. Prvním je defekt v inducibilitě transkripčně regulovaných genů, které nicméně neobsahují intron. Druhým je nález genetických interakcí mezi *prp45*(1-169) a delečními alelami genů kódujících faktory podílející se na elongaci transkripce a modifikacích chromatinu. Panel genetických interaktorů odhalených metodou SGA a panel genů, jejichž exprese byla u buněk *prp45*(1-169) změněna, se přitom nepřekrývá. Třetím je nález z laboratoře prof. K. Strässer v německém Giessenu, kde pomocí chromatinové imunoprecipitace za RNA Pol II zjišťovali efektivitu elongace transkripce u buněk *prp45*(1-169) na rekombinantním templátu. Výsledky ukázaly, že buňky *prp45*(1-169) vykazují defekt v elongaci transkripce srovnatelný s jinými elongačními faktory (S. Chanarat, nepublikovaná data).

Alela *prp45*(1-169) vede k akumulaci zvýšeného množství pre-mRNA, což samo o sobě odpovídá fenotypu jiných alel sestřihových faktorů. Kombinace mutace *prp45*(1-169) a delece genů kódujících faktory související s elongací transkripce nebo

modifikacemi chromatinu, u kterých byl pozorován syntetický efekt na úrovni růstu, ale neodhalila genetickou interakci na úrovni akumulace pre-mRNA. Tato fakta by naznačovala, že funkce Prp45 při sestřihu je nezávislá na jeho roli při transkripci. Pro vysvětlení fungování Prp45 na pomezí transkripce a sestřihu jsme navrhli několik vzájemně se nevylučujících hypotéz.

6.4.2. Hypotézy o mechanismu spřažení sestřihu a transkripce prostřednictvím Prp45

(a) První hypotézou, která se pro vysvětlení vlivu sestřihového faktoru Prp45 na zpožděnou indukci genů bez intronů nabízí, je, že jde o nepřímý efekt aberantního sestřihu nějakého faktoru regulujícího transkripci. V současné době jsme na základě výsledků získaných metodou RNA-seq vytypovali několik kandidátních genů obsahujících intron a podílejících se na regulaci iniciace a elongace transkripce, kterých by se ovlivnění mohlo týkat. Pracujeme na pokusech, kdy v těchto genech intron deletujeme a budeme zkoumat, zda stále dochází ke zpožděné indukci genů *PHO* a dalších genů bez intronu. Plánujeme rovněž ověřit genetické interakce mezi *prp45*(1-169) a delečními alelami dříve identifikovaných genetických interaktorů na pozadí těchto kmenů.

(b) Ovlivnění transkripce skrze defektní sestřih nějaké komponenty transkripce však pokládáme za méně pravděpodobné, protože alela *prp45*(1-169) geneticky interaguje jen s některými delečními alelami genů souvisejících s transkripcí a modifikacemi chromatinu. To, že Prp45 ovlivňuje procesy v rámci transkripce a/nebo modifikací chromatinu selektivně, by svědčilo pro to, že jeho efekt je přímý. Na základě porovnání map genetických interaktorů bylo zjištěno, že geny kódující proteiny působící ve stejné dráze nebo procesu mají podobnou interakční mapu. Znalost genetické interakční mapy nějakého proteinu je tak cenným nástrojem při hledání funkce daného proteinu (Costanzo et al. 2016). Genetická interakční mapa Prp45 svědčí pro jeho roli v procesech souvisejících s regulací chromatinu. Je pozoruhodné, že obdobné spojení s procesy regulace chromatinu vykazují také všechny sestřihové helikázy (Cordin & Beggs 2013). Jde o proteiny, které jsou klíčové pro vytváření a uvolňování interakcí RNA a proteinů v průběhu sestřihu. Prp45 je proteinem, který má díky své extendované struktuře předpoklady k ovlivnění asociativních vlastností formujících se komplexů. Jak v případě flexibilních interakčních platforem („rope-like“ proteiny jako Prp45; (Yan et al. 2019)), tak v případě helikáz (Cordin & Beggs 2013) jde o formování interakcí, které nutně souvisejí s okolním prostředím – s mikrodoménou, ve které probíhá transkripce a v bezprostřední časové návaznosti i sestřih. Pro hledání konkrétních souvislostí se nabízejí zejména silné genetické interakce Prp45 s alelou H2A.Z a s alelami komplexu SRW1. Projev alel H2A.Z závisí na tom, jak je ovlivněna rovnováha depozice a odstranění H2A.Z, ve které se angažují jak komplexy SWR1 a INO80 a případně další remodelační komplexy, tak i proteiny v roli chaperonů (Gerhold & Gasser 2014; Liu et al. 2014). Prp45 je v tomto ohledu možným „chaperonem“ H2A.Z.

Vliv Prp45 na inducibilitu genů bez intronů může být zprostředkován nepřímo, například vyvazováním komponent na místech probíhajícího sestřihu, které pak nejsou dostupné jinde, nebo přímo. Pro fyzickou přítomnost sestřihových faktorů na genech bez intronů jsou precedentní doklady. Takto byly detekovány U1 snRNP (Spiluttini et al. 2010; Brody et al. 2011) i protein Mud2. Navíc byla pozorována přímá fyzická interakce mezi Mud2 a Prp19 (Minocha et al. 2018), což by mohlo naznačovat, že i Prp19 je vyvazován ke genům bez intronů. Prp19 je komponenta komplexu NTC, se kterým Prp45 také interaguje. Proto je možné, že prostřednictvím této interakce je ke genům bez intronů vyvazován i Prp45.

(c) Další hypotéza o způsobu spřažení transkripce a sestřihu prostřednictvím Prp45 souvisí s fenoménem fázové separace. Jak bylo uvedeno v kapitole 2.2.1, o prostředí v buňce se věří, že je tvořeno určitými mikrodomény, což jsou membránou neohraničené útvary, jejichž vznik spoluurčují proteiny s vnitřně neuspořádanou strukturou. Kvůli provázanosti celé mikrodomény se ovlivnění na jedné straně, například v podobě posttranslační modifikace, může skrze konformační změny proteinů velmi rychle přenést do jiné části mikrodomény, kde ústí v ovlivnění tam probíhajících procesů. Vzhledem k tomu, že Prp45 zaujímá velmi extendovanou strukturu s dlouhými vnitřně neuspořádanými oblastmi, je možné, že přispívá k fázové separaci mikrodomén, ve kterých transkripce a sestřih probíhají. Tato hypotéza by také vysvětlila to, že Prp45 je schopen ovlivnit sestavování spliceosomu ještě před tím, než je detekován jako stabilní součást spliceosomu.

7. Závěr

V rámci svého doktorského projektu jsem charakterizovala funkci orthologa proteinu SKIP z kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*, Prp45, z hlediska jeho zapojení do sestřihu pre-mRNA a z hlediska toho, zda a jak ovlivňuje transkripci.

ad cíl 1) Analýza dat získaných metodou RNA-seq odhalila akumulaci pre-mRNA u buněk *prp45*(1-169), zatímco hladiny mRNA byly ovlivněny jen marginálně. Míra defektu v sestřihu nekorelovala s kánonicitou 5' sestřihového místa nebo místa větvení.

ad cíl 2) Zvýšená hladina pre-mRNA u buněk *prp45*(1-169) zřejmě není výsledkem defektu v degračních drahách specifických pro RNA.

ad cíl 3) Metoda chromatinové imunoprecipitace odhalila, že u buněk *prp45*(1-169) dochází k defektu v sestavování spliceosomu v kroku vyvazování U2 snRNP.

ad cíl 4) Syntetický fenotyp na úrovni indukce genů neobsahujících intron vykazuje mutace *prp45*(1-169) jen s deleční alelou genu *RAD6*. Deleční alely dvou dalších genů (*UBP8* a *SET1*) syntetický efekt nevykazují a u dalších dvou genů (*BUR2* a *PAF1*) jej ve sledovaných časech nelze postihnout.

ad cíl 5) U většiny kmenů s delecí jednoho z genů kódujících regulátory transkripce nebo modifikátory chromatinu nebyla odhalena akumulace pre-mRNA. Výjimkou byly buňky s deleční alelou *GCN5*, u které už byla akumulace pre-mRNA pozorována dříve (Gunderson et al. 2011), a buňky s deleční alelou *BUR2*, což bylo pozorováno poprvé. Syntetická interakce na úrovni akumulace pre-mRNA mezi *prp45*(1-169) a některou z testovaných alel však pozorována nebyla.

ad cíl 6) Metoda SGA odhalila celkem 183 delečních alel, které byly v syntetické interakci s *prp45*(1-169). Asi 30 % z těchto interaktorů funkčně souvisí s transkripcí a modifikacemi chromatinu.

ad cíle 7 a 8) Nejsilnějšími nalezenými genetickými interaktory alely *prp45*(1-169) byly deleční alely genů kódujících histon H2A.Z a komponenty komplexu SWR1. Tyto interakce byly ověřeny nezávisle v kmenech jiného genetického pozadí. Pro další testování funkčního vztahu mezi *PRP45* a *HTZ1* byly vytvořeny mutace *prp45*(1-247) a *prp45*(1-330) a jejich fenotyp byl charakterizován na úrovni růstu a na úrovni akumulace pre-mRNA.

8. Seznam publikací

- 1) Převorovský M, **Hálová M**, Abrhánová K, Libus J, Folk P. **Workflow for Genome-Wide Determination of Pre-mRNA Splicing Efficiency from Yeast RNA-seq Data**. Biomed Res Int. 2016;2016:4783841. (IF 2,55)
- 2) **Hálová M**, Gahura O, Převorovský M, Cit Z, Novotný M, Valentová A, Abrhánová K, Půta F, Folk P. **Nineteen complex-related factor Prp45 is required for the early stages of cotranscriptional spliceosome assembly**. RNA. 2017 Oct;23(10):1512-1524. (IF 4,49)
- 3) Abrhánová K, Nemčko F, Libus J, Převorovský M, **Hálová M**, Půta F, Folk P. **Introns provide a platform for intergenic regulatory feedback of RPL22 paralogs in yeast**. PLoS One. 2018 Jan 5;13(1):e0190685. (IF 2,766)
- 4) Přípravovaný manuskript:

Hálová M, Abrhánová K, Valentová A, Půta F, Sunnerhagen P, Liu B, Folk P. **Genetic interactions of *PRP45* alleles highlight the dependence of splicing on H2A.Z**.

V rámci první publikace jsem připravovala RNA pro sekvenaci. Rovněž jsem se podílela na sepsání rukopisu a také na ověřování správnosti publikovaného skriptu pro analýzu v programu R.

V rámci druhé publikace jsem se podílela na analýze dat získaných metodou RNA-seq (obrázky 1c, d) a měřila jsem také hladiny pre-mRNA a mRNA některých genů zobrazených na obrázcích 1e, f. Provedla jsem rovněž všechny experimenty metodou chromatinové imunoprecipitace (Obr. 4). Participovala jsem i na sepsání rukopisu a jeho revizi a také jsem graficky zpracovala všechny obrázky.

V rámci třetí publikace jsem technikou qPCR měřila hladiny mRNA a pre-mRNA genů *RPL22A*, *RPL22B*, *ECM33* a *COF1* u buněk mutovaných v *prp45*(1-169), u buněk s delecí genů pro degradační faktory a u odpovídajících dvojitéch mutant (obrázek S4). Podílela jsem se rovněž na revizi rukopisu.

Školitel svým podpisem stvrzuje souhlas s výše uvedenými údaji.

Doc. RNDr. Petr Folk, CSc.

9. Přehled literatury

Diplomové a disertační práce:

M. Hálová, 2011, Diplomová práce

M. Oplová, 2015, Diplomová práce

L. Kovařová, 2018, Diplomová práce

K. Abrahámová, 2010, Disertační práce

Abovich, N., Liao, X.C. & Rosbash, M., 1994. The yeast MUD2 protein: an interaction with PRP11 defines a bridge between commitment complexes and U2 snRNP addition. *Genes & development*, 8(7), pp.843–854.

Abrahámová, K. et al., 2018. Introns provide a platform for intergenic regulatory feedback of RPL22 paralogs in yeast. *PloS one*, 13(1), p.e0190685.

Albers, M. et al., 2003. Identification and characterization of Prp45p and Prp46p, essential pre-mRNA splicing factors. *RNA*, 9(1), pp.138–150.

Albert, I. et al., 2007. Translational and rotational settings of H2A.Z nucleosomes across the *Saccharomyces cerevisiae* genome. *Nature*, 446(7135), pp.572–576.

Albulescu, L.-O. et al., 2012. A Quantitative, High-Throughput Reverse Genetic Screen Reveals Novel Connections between Pre-mRNA Splicing and 5' and 3' End Transcript Determinants. *PLoS genetics*, 8(3), p.e1002530.

Allison, L.A. et al., 1985. Extensive homology among the largest subunits of eukaryotic and prokaryotic RNA polymerases. *Cell*, 42(2), pp.599–610.

Altaf, M. et al., 2010. NuA4-dependent Acetylation of Nucleosomal Histones H4 and H2A Directly Stimulates Incorporation of H2A.Z by the SWR1 Complex. *The Journal of biological chemistry*, 285(21), pp.15966–15977.

Ambrozková, M. et al., 2001. The fission yeast ortholog of the coregulator SKIP interacts with the small subunit of U2AF. *Biochemical and biophysical research communications*, 284(5), pp.1148–1154.

Arenas, J.E. & Abelson, J.N., 1997. Prp43: An RNA helicase-like factor involved in spliceosome disassembly. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(22), pp.11798–11802.

Ares, M., Grate, L. & Pauling, M.H., 1999. A handful of intron-containing genes produces the lion's share of yeast mRNA. *RNA*, 5(9), pp.1138–1139.

Aslanzadeh, V. et al., 2018. Transcription rate strongly affects splicing fidelity and cotranscriptionality in budding yeast. *Genome research*, 28(2), pp.203–213.

Ast, G., 2004. How did alternative splicing evolve? *Nature reviews. Genetics*, 5(10), pp.773–782.

Auger, A. et al., 2008. Eaf1 is the platform for NuA4 molecular assembly that evolutionarily links chromatin acetylation to ATP-dependent exchange of histone H2A variants. *Molecular and cellular biology*, 28(7), pp.2257–2270.

- Baejen, C. et al., 2014. Transcriptome maps of mRNP biogenesis factors define pre-mRNA recognition. *Molecular cell*, 55(5), pp.745–757.
- Baudino, T.A. et al., 1998. Isolation and characterization of a novel coactivator protein, NCoA-62, involved in vitamin D-mediated transcription. *The Journal of biological chemistry*, 273(26), pp.16434–16441.
- Beilharz, T.H. et al., 2017. Coordination of Cell Cycle Progression and Mitotic Spindle Assembly Involves Histone H3 Lysine 4 Methylation by Set1/COMPASS. *Genetics*, 205(1), pp.185–199.
- Berglund, J.A. et al., 1997. The splicing factor BBP interacts specifically with the pre-mRNA branchpoint sequence UACUAAC. *Cell*, 89(5), pp.781–787.
- Bertram, K. et al., 2017. Cryo-EM structure of a human spliceosome activated for step 2 of splicing. *Nature*, 542(7641), pp.318–323.
- Biswas, D. et al., 2005. The Yeast FACT Complex Has a Role in Transcriptional Initiation. *Molecular and cellular biology*, 25(14), pp.5812–5822.
- Bonnet, J. et al., 2014. The SAGA coactivator complex acts on the whole transcribed genome and is required for RNA polymerase II transcription. *Genes & development*, 28(18), pp.1999–2012.
- Brès, V. et al., 2005. A human splicing factor, SKIP, associates with P-TEFb and enhances transcription elongation by HIV-1 Tat. *Genes & development*, 19(10), pp.1211–1226.
- Brès, V. et al., 2009. SKIP interacts with c-Myc and Menin to promote HIV-1 Tat transactivation. *Molecular cell*, 36(1), pp.75–87.
- Briggs, S.D. et al., 2002. Gene silencing: trans-histone regulatory pathway in chromatin. *Nature*, 418(6897), p.498.
- Briggs, S.D. et al., 2001. Histone H3 lysine 4 methylation is mediated by Set1 and required for cell growth and rDNA silencing in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes & development*, 15(24), pp.3286–3295.
- Brody, Y. et al., 2011. The in vivo kinetics of RNA polymerase II elongation during co-transcriptional splicing. *PLoS biology*, 9(1), p.e1000573.
- Bryk, M. et al., 2002. Evidence that Set1, a Factor Required for Methylation of Histone H3, Regulates rDNA Silencing in *S. cerevisiae* by a Sir2-Independent Mechanism. *Current biology: CB*, 12(2), pp.165–170.
- Buratowski, S. & Kim, T., 2010. The role of cotranscriptional histone methylations. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*, 75, pp.95–102.
- Camblong, J. et al., 2007. Antisense RNA Stabilization Induces Transcriptional Gene Silencing via Histone Deacetylation in *S. cerevisiae*. *Cell*, 131(4), pp.706–717.
- Camblong, J. et al., 2009. Trans-acting antisense RNAs mediate transcriptional gene cosuppression in *S. cerevisiae*. *Genes & development*, 23(13), pp.1534–1545.
- Candau, R. et al., 1997. Histone acetyltransferase activity and interaction with ADA2 are critical for GCN5 function in vivo. *The EMBO journal*, 16(3), pp.555–565.

- Carey, M., Li, B. & Workman, J.L., 2006. RSC exploits histone acetylation to abrogate the nucleosomal block to RNA polymerase II elongation. *Molecular cell*, 24(3), pp.481–487.
- Carmen, A.A. et al., 1999. Yeast HOS3 forms a novel trichostatin A-insensitive homodimer with intrinsic histone deacetylase activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(22), pp.12356–12361.
- Carrillo Oesterreich, F. et al., 2016a. Splicing of Nascent RNA Coincides with Intron Exit from RNA Polymerase II. *Cell*, 165(2), pp.372–381.
- Carrillo Oesterreich, F. et al., 2016b. Splicing of Nascent RNA Coincides with Intron Exit from RNA Polymerase II. *Cell*, 165(2), pp.372–381.
- Carrocci, T.J., Paulson, J.C. & Hoskins, A.A., 2018. Functional analysis of Hsh155/SF3b1 interactions with the U2 snRNA/branch site duplex. *RNA*, 24(8), pp.1028–1040.
- Carvin, C.D. & Kladde, M.P., 2004. Effectors of lysine 4 methylation of histone H3 in *Saccharomyces cerevisiae* are negative regulators of PHO5 and GAL1-10. *The Journal of biological chemistry*, 279(32), pp.33057–33062.
- Chandrasekharan, M.B. et al., 2010. Histone H2B C-terminal helix mediates trans-histone H3K4 methylation independent of H2B ubiquitination. *Molecular and cellular biology*, 30(13), pp.3216–3232.
- Chandrasekharan, M.B., Huang, F. & Sun, Z.-W., 2009. Ubiquitination of histone H2B regulates chromatin dynamics by enhancing nucleosome stability. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(39), pp.16686–16691.
- Charenton, C., Wilkinson, M.E. & Nagai, K., 2019. Mechanism of 5' splice site transfer for human spliceosome activation. *Science*. Available at: <http://dx.doi.org/10.1126/science.aax3289>.
- Chen, Y., Zhang, L. & Jones, K.A., 2011. SKIP counteracts p53-mediated apoptosis via selective regulation of p21Cip1 mRNA splicing. *Genes & development*, 25(7), pp.701–716.
- Chung, S., McLean, M.R. & Rymond, B.C., 1999. Yeast ortholog of the *Drosophila* crooked neck protein promotes spliceosome assembly through stable U4/U6.U5 snRNP addition. *RNA*, 5(8), pp.1042–1054.
- Cismowski, M.J. et al., 1995. KIN28 encodes a C-terminal domain kinase that controls mRNA transcription in *Saccharomyces cerevisiae* but lacks cyclin-dependent kinase-activating kinase (CAK) activity. *Molecular and cellular biology*, 15(6), pp.2983–2992.
- Collepardo-Guevara, R. et al., 2015. Chromatin Unfolding by Epigenetic Modifications Explained by Dramatic Impairment of Internucleosome Interactions: A Multiscale Computational Study. *Journal of the American Chemical Society*, 137(32), pp.10205–10215.
- Collins, S.R. et al., 2007. Functional dissection of protein complexes involved in yeast chromosome biology using a genetic interaction map. *Nature*, 446(7137), pp.806–810.
- Company, M., Arenas, J. & Abelson, J., 1991. Requirement of the RNA helicase-like protein PRP22 for release of messenger RNA from spliceosomes. *Nature*, 349(6309), pp.487–493.

- Corden, J.L. et al., 1985. A unique structure at the carboxyl terminus of the largest subunit of eukaryotic RNA polymerase II. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 82(23), pp.7934–7938.
- Cordin, O. & Beggs, J.D., 2013. RNA helicases in splicing. *RNA biology*, 10(1), pp.83–95.
- Cordin, O., Hahn, D. & Beggs, J.D., 2012. Structure, function and regulation of spliceosomal RNA helicases. *Current opinion in cell biology*, 24(3), pp.431–438.
- Costanzo, M. et al., 2016. A global genetic interaction network maps a wiring diagram of cellular function. *Science*, 353(6306). Available at: <http://dx.doi.org/10.1126/science.aaf1420>.
- Courchaine, E.M., Lu, A. & Neugebauer, K.M., 2016. Droplet organelles? *The EMBO journal*, 35(15), pp.1603–1612.
- Crisucci, E.M. & Arndt, K.M., 2012. Paf1 restricts Gcn4 occupancy and antisense transcription at the ARG1 promoter. *Molecular and cellular biology*, 32(6), pp.1150–1163.
- Dahl, R., Wani, B. & Hayman, M.J., 1998. The Ski oncoprotein interacts with Skip, the human homolog of Drosophila Bx42. *Oncogene*, 16(12), pp.1579–1586.
- Daniel, J.A. et al., 2004. Deubiquitination of histone H2B by a yeast acetyltransferase complex regulates transcription. *The Journal of biological chemistry*, 279(3), pp.1867–1871.
- David, C.J. et al., 2011. The RNA polymerase II C-terminal domain promotes splicing activation through recruitment of a U2AF65-Prp19 complex. *Genes & development*, 25(9), pp.972–983.
- Dehé, P.-M. et al., 2006. Protein interactions within the Set1 complex and their roles in the regulation of histone 3 lysine 4 methylation. *The Journal of biological chemistry*, 281(46), pp.35404–35412.
- Dekker, J., Marti-Renom, M.A. & Mirny, L.A., 2013. Exploring the three-dimensional organization of genomes: interpreting chromatin interaction data. *Nature reviews. Genetics*, 14(6), pp.390–403.
- Desai, U.J. & Pfaffle, P.K., 1995. Single-step purification of a thermostable DNA polymerase expressed in Escherichia coli. *BioTechniques*, 19(5), pp.780–2, 784.
- Deutschbauer, A.M. & Davis, R.W., 2005. Quantitative trait loci mapped to single-nucleotide resolution in yeast. *Nature Genetics*, 37(12), pp.1333–1340. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/ng1674>.
- Deutsch, M. & Long, M., 1999. Intron-exon structures of eukaryotic model organisms. *Nucleic acids research*, 27(15), pp.3219–3228.
- Dixon, J.R. et al., 2012. Topological domains in mammalian genomes identified by analysis of chromatin interactions. *Nature*, 485(7398), pp.376–380.
- Dziembowski, A. et al., 2004. Proteomic analysis identifies a new complex required for nuclear pre-mRNA retention and splicing. *The EMBO journal*, 23(24), pp.4847–4856.
- Eltsov, M. et al., 2008. Analysis of cryo-electron microscopy images does not support the existence of 30-nm chromatin fibers in mitotic chromosomes in situ. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(50), pp.19732–19737.

- Fabrizio, P. et al., 2009. The evolutionarily conserved core design of the catalytic activation step of the yeast spliceosome. *Molecular cell*, 36(4), pp.593–608.
- Fica, S.M. et al., 2017. Structure of a spliceosome remodelled for exon ligation. *Nature*, 542(7641), pp.377–380.
- Finch, J.T. & Klug, A., 1976. Solenoidal model for superstructure in chromatin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 73(6), pp.1897–1901.
- Fleming, A.B. et al., 2008. H2B ubiquitylation plays a role in nucleosome dynamics during transcription elongation. *Molecular cell*, 31(1), pp.57–66.
- Folk, P. et al., 1996. The homolog of chromatin binding protein Bx42 identified in *Dictyostelium*. *Gene*, 181(1-2), pp.229–231.
- Folk, P., Půta, F. & Skrzurný, M., 2004. Transcriptional coregulator SNW/SKIP: the concealed tie of dissimilar pathways. *Cellular and molecular life sciences: CMLS*, 61(6), pp.629–640.
- Formosa, T. et al., 2001. Spt16-Pob3 and the HMG protein Nhp6 combine to form the nucleosome-binding factor SPN. *The EMBO journal*, 20(13), pp.3506–3517.
- Fussner, E., Ching, R.W. & Bazett-Jones, D.P., 2011. Living without 30nm chromatin fibers. *Trends in biochemical sciences*, 36(1), pp.1–6.
- Gabunilas, J. & Chanfreau, G., 2016. Splicing-Mediated Autoregulation Modulates Rpl22p Expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS genetics*, 12(4), p.e1005999.
- Gahura, O. et al., 2009. Prp45 affects Prp22 partition in spliceosomal complexes and splicing efficiency of non-consensus substrates. *Journal of cellular biochemistry*, 106(1), pp.139–151.
- Gahura, O. et al., 2011. Secondary structure is required for 3' splice site recognition in yeast. *Nucleic acids research*, 39(22), pp.9759–9767.
- Galej, W.P. et al., 2016. Cryo-EM structure of the spliceosome immediately after branching. *Nature*, 537(7619), pp.197–201.
- Garber, M.E. & Jones, K.A., 1999. HIV-1 Tat: coping with negative elongation factors. *Current opinion in immunology*, 11(4), pp.460–465.
- Gerhold, C.B. & Gasser, S.M., 2014. INO80 and SWR complexes: relating structure to function in chromatin remodeling. *Trends in cell biology*, 24(11), pp.619–631.
- Giangrande, P.H. et al., 2003. Identification of E-Box Factor TFE3 as a Functional Partner for the E2F3 Transcription Factor. *Molecular and cellular biology*, 23(11), pp.3707–3720.
- Gilbert, W., Siebel, C.W. & Guthrie, C., 2001. Phosphorylation by Sky1p promotes Npl3p shuttling and mRNA dissociation. *RNA*, 7(2), pp.302–313.
- Ginsburg, D.S., Govind, C.K. & Hinnebusch, A.G., 2009. NuA4 lysine acetyltransferase Esa1 is targeted to coding regions and stimulates transcription elongation with Gen5. *Molecular and cellular biology*, 29(24), pp.6473–6487.
- Görnemann, J. et al., 2005. Cotranscriptional Spliceosome Assembly Occurs in a Stepwise Fashion and Requires the Cap Binding Complex. *Molecular cell*, 19(1), pp.53–63.

- Govind, C.K. et al., 2007. Gcn5 promotes acetylation, eviction, and methylation of nucleosomes in transcribed coding regions. *Molecular cell*, 25(1), pp.31–42.
- Grainger, R.J. & Beggs, J.D., 2005. Prp8 protein: at the heart of the spliceosome. *RNA*, 11(5), pp.533–557.
- Grant, P.A. et al., 1997. Yeast Gcn5 functions in two multisubunit complexes to acetylate nucleosomal histones: characterization of an Ada complex and the SAGA (Spt/Ada) complex. *Genes & development*, 11(13), pp.1640–1650.
- Gu, B., Eick, D. & Bensaude, O., 2012. CTD serine-2 plays a critical role in splicing and termination factor recruitment to RNA polymerase II in vivo. *Nucleic acids research*, 41(3), pp.1591–1603.
- Guillemette, B. et al., 2005. Variant Histone H2A.Z Is Globally Localized to the Promoters of Inactive Yeast Genes and Regulates Nucleosome Positioning. *PLoS biology*, 3(12), p.e384.
- Gu, M. et al., 2015. H2A.Z marks antisense promoters and has positive effects on antisense transcript levels in budding yeast. *BMC genomics*, 16, p.99.
- Gunderson, F.Q. & Johnson, T.L., 2009. Acetylation by the Transcriptional Coactivator Gcn5 Plays a Novel Role in Co-Transcriptional Spliceosome Assembly. *PLoS genetics*, 5(10), p.e1000682.
- Gunderson, F.Q., Merkhofer, E.C. & Johnson, T.L., 2011. Dynamic histone acetylation is critical for cotranscriptional spliceosome assembly and spliceosomal rearrangements. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(5), pp.2004–2009.
- Häcker, S. & Krebber, H., 2004. Differential export requirements for shuttling serine/arginine-type mRNA-binding proteins. *The Journal of biological chemistry*, 279(7), pp.5049–5052.
- Hálová, M. et al., 2017. Nineteen complex-related factor Prp45 is required for the early stages of cotranscriptional spliceosome assembly. *RNA*, 23(10), pp.1512–1524.
- Harlen, K.M. et al., 2016. Comprehensive RNA Polymerase II Interactomes Reveal Distinct and Varied Roles for Each Phospho-CTD Residue. *Cell reports*, 15(10), pp.2147–2158.
- Harris, S.D. et al., 1992. Molecular analysis of *Saccharomyces cerevisiae* chromosome I. On the number of genes and the identification of essential genes using temperature-sensitive-lethal mutations. *Journal of molecular biology*, 225(1), pp.53–65.
- Henry, K.W. et al., 2003. Transcriptional activation via sequential histone H2B ubiquitylation and deubiquitylation, mediated by SAGA-associated Ubp8. *Genes & development*, 17(21), pp.2648–2663.
- Hérissant, L. et al., 2014. H2B ubiquitylation modulates spliceosome assembly and function in budding yeast. *Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization*, 106(4), pp.126–138.
- Herzel, L. et al., 2017. Splicing and transcription touch base: co-transcriptional spliceosome assembly and function. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 18(10), pp.637–650.
- Hintermair, C. et al., 2016. Specific threonine-4 phosphorylation and function of RNA polymerase II CTD during M phase progression. *Scientific Reports*, 6(1). Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/srep27401>.

- Hintermair, C. et al., 2012. Threonine-4 of mammalian RNA polymerase II CTD is targeted by Polo-like kinase 3 and required for transcriptional elongation. *The EMBO journal*, 31(12), pp.2784–2797.
- Hnisz, D. et al., 2017. A Phase Separation Model for Transcriptional Control. *Cell*, 169(1), pp.13–23.
- Horowitz, D.S., 2011. The splice is right: guarantors of fidelity in pre-mRNA splicing. *RNA*, 17(4), pp.551–554.
- Howe, L. et al., 2002. Yng1p modulates the activity of Sas3p as a component of the yeast NuA3 Hhistone acetyltransferase complex. *Molecular and cellular biology*, 22(14), pp.5047–5053.
- Hsin, J.-P. et al., 2011. RNAP II CTD Phosphorylated on Threonine-4 Is Required for Histone mRNA 3' End Processing. *Science*, 334(6056), pp.683–686. Available at: <http://dx.doi.org/10.1126/science.1206034>.
- Hsin, J.-P., Xiang, K. & Manley, J.L., 2014. Function and control of RNA polymerase II C-terminal domain phosphorylation in vertebrate transcription and RNA processing. *Molecular and cellular biology*, 34(13), pp.2488–2498.
- Huang, D., Moffat, J. & Andrews, B., 2002. Dissection of a complex phenotype by functional genomics reveals roles for the yeast cyclin-dependent protein kinase Pho85 in stress adaptation and cell integrity. *Molecular and cellular biology*, 22(14), pp.5076–5088.
- Huang, F. et al., 2015. Interaction of the Jhd2 Histone H3 Lys-4 Demethylase with Chromatin Is Controlled by Histone H2A Surfaces and Restricted by H2B Ubiquitination. *The Journal of biological chemistry*, 290(48), pp.28760–28777.
- Huber, W. et al., 2015. Orchestrating high-throughput genomic analysis with Bioconductor. *Nature Methods*, 12(2), pp.115–121. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nmeth.3252>.
- Hung, S.-H. et al., 2017. Monoubiquitylation of histone H2B contributes to the bypass of DNA damage during and after DNA replication. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(11), pp.E2205–E2214.
- Huranová, M. et al., 2010. The differential interaction of snRNPs with pre-mRNA reveals splicing kinetics in living cells. *The Journal of cell biology*, 191(1), pp.75–86.
- Hwang, W.W. et al., 2003. A conserved RING finger protein required for histone H2B monoubiquitination and cell size control. *Molecular cell*, 11(1), pp.261–266.
- Jackson, J.D. & Gorovsky, M.A., 2000. Histone H2A.Z has a conserved function that is distinct from that of the major H2A sequence variants. *Nucleic acids research*, 28(19), pp.3811–3816.
- Jeronimo, C. et al., 2015. The Histone Chaperones FACT and Spt6 Restrict H2A.Z from Intragenic Locations. *Molecular cell*, 58(6), pp.1113–1123.
- Jin, C. & Felsenfeld, G., 2007. Nucleosome stability mediated by histone variants H3.3 and H2A.Z. *Genes & development*, 21(12), pp.1519–1529.
- Jurica, M.S. et al., 2002. Purification and characterization of native spliceosomes suitable for three-dimensional structural analysis. *RNA*, 8(4), pp.426–439. Available at: <http://dx.doi.org/10.1017/s1355838202021088>.

- Kaffman, A. et al., 1994. Phosphorylation of the transcription factor PHO4 by a cyclin-CDK complex, PHO80-PHO85. *Science*, 263(5150), pp.1153–1156.
- Kaffman, A., Rank, N.M., O'Neill, E.M., et al., 1998. The receptor Msn5 exports the phosphorylated transcription factor Pho4 out of the nucleus. *Nature*, 396(6710), pp.482–486.
- Kaffman, A., Rank, N.M. & O'Shea, E.K., 1998. Phosphorylation regulates association of the transcription factor Pho4 with its import receptor Pse1/Kap121. *Genes & development*, 12(17), pp.2673–2683.
- Kalashnikova, A.A. et al., 2013. The role of the nucleosome acidic patch in modulating higher order chromatin structure. *Journal of the Royal Society, Interface / the Royal Society*, 10(82), p.20121022.
- Katinka, M.D. et al., 2001. Genome sequence and gene compaction of the eukaryote parasite *Encephalitozoon cuniculi*. *Nature*, 414(6862), pp.450–453.
- Kim, D., Langmead, B. & Salzberg, S.L., 2015. HISAT: a fast spliced aligner with low memory requirements. *Nature methods*, 12(4), pp.357–360.
- Kim, J. et al., 2013. The n-SET domain of Set1 regulates H2B ubiquitylation-dependent H3K4 methylation. *Molecular cell*, 49(6), pp.1121–1133.
- Kim, T. & Buratowski, S., 2009. Dimethylation of H3K4 by Set1 recruits the Set3 histone deacetylase complex to 5' transcribed regions. *Cell*, 137(2), pp.259–272.
- Kim, Y.J. et al., 2001. The product of an oculopharyngeal muscular dystrophy gene, poly(A)-binding protein 2, interacts with SKIP and stimulates muscle-specific gene expression. *Human molecular genetics*, 10(11), pp.1129–1139.
- Kobor, M.S. et al., 2004. A Protein Complex Containing the Conserved Swi2/Snf2-Related ATPase Swr1p Deposits Histone Variant H2A.Z into Euchromatin. *PLoS biology*, 2(5), p.e131.
- Koch, F. et al., 2008. Genome-wide RNA polymerase II: not genes only! *Trends in biochemical sciences*, 33(6), pp.265–273.
- Komarnitsky, P., Cho, E.J. & Buratowski, S., 2000. Different phosphorylated forms of RNA polymerase II and associated mRNA processing factors during transcription. *Genes & development*, 14(19), pp.2452–2460.
- Komeili, A. & O'Shea, E.K., 1999. Roles of phosphorylation sites in regulating activity of the transcription factor Pho4. *Science*, 284(5416), pp.977–980.
- Konarska, M.M., Vilardell, J. & Query, C.C., 2006. Repositioning of the reaction intermediate within the catalytic center of the spliceosome. *Molecular cell*, 21(4), pp.543–553.
- Koodathingal, P. et al., 2010. The DEAH box ATPases Prp16 and Prp43 cooperate to proofread 5' splice site cleavage during pre-mRNA splicing. *Molecular cell*, 39(3), pp.385–395.
- Koodathingal, P. & Staley, J.P., 2013. Splicing fidelity: DEAD/H-box ATPases as molecular clocks. *RNA biology*, 10(7), pp.1073–1079.
- Kornblihtt, A.R., 2007. Coupling Transcription and Alternative Splicing. In *Advances in Experimental Medicine and Biology*. pp. 175–189.

- Korneta, I. & Bujnicki, J.M., 2012. Intrinsic disorder in the human spliceosomal proteome. *PLoS computational biology*, 8(8), p.e1002641.
- Kotovic, K.M. et al., 2003. Cotranscriptional Recruitment of the U1 snRNP to Intron-Containing Genes in Yeast. *Molecular and cellular biology*, 23(16), pp.5768–5779.
- Kress, T.L., Krogan, N.J. & Guthrie, C., 2008. A single SR-like protein, Npl3, promotes pre-mRNA splicing in budding yeast. *Molecular cell*, 32(5), pp.727–734.
- Krogan, N.J., Keogh, M.-C., et al., 2003. A Snf2 family ATPase complex required for recruitment of the histone H2A variant Htz1. *Molecular cell*, 12(6), pp.1565–1576.
- Krogan, N.J., Kim, M., et al., 2003. Methylation of histone H3 by Set2 in *Saccharomyces cerevisiae* is linked to transcriptional elongation by RNA polymerase II. *Molecular and cellular biology*, 23(12), pp.4207–4218.
- Krogan, N.J. et al., 2004. Regulation of chromosome stability by the histone H2A variant Htz1, the Swr1 chromatin remodeling complex, and the histone acetyltransferase NuA4. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(37), pp.13513–13518.
- Kupfer, D.M. et al., 2004. Introns and splicing elements of five diverse fungi. *Eukaryotic cell*, 3(5), pp.1088–1100.
- Kwon, I. et al., 2013. Phosphorylation-regulated binding of RNA polymerase II to fibrous polymers of low-complexity domains. *Cell*, 155(5), pp.1049–1060.
- Ladurner, A.G. et al., 2003. Bromodomains mediate an acetyl-histone encoded antisilencing function at heterochromatin boundaries. *Molecular cell*, 11(2), pp.365–376.
- Lee, J.-S. et al., 2007. Histone crosstalk between H2B monoubiquitination and H3 methylation mediated by COMPASS. *Cell*, 131(6), pp.1084–1096.
- Leong, G.M. et al., 2001. Ski-interacting Protein Interacts with Smad Proteins to Augment Transforming Growth Factor- β -dependent Transcription. *The Journal of biological chemistry*, 276(21), pp.18243–18248.
- Liang, G. et al., 2007. Yeast Jhd2p is a histone H3 Lys4 trimethyl demethylase. *Nature structural & molecular biology*, 14(3), pp.243–245.
- Liang, W.-W. & Cheng, S.-C., 2015. A novel mechanism for Prp5 function in prespliceosome formation and proofreading the branch site sequence. *Genes & development*, 29(1), pp.81–93.
- Li, B. et al., 2005. Preferential occupancy of histone variant H2AZ at inactive promoters influences local histone modifications and chromatin remodeling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(51), pp.18385–18390.
- Li, H. et al., 2009. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics*, 25(16), pp.2078–2079. Available at: <http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/btp352>.
- Liu, H. et al., 2014. Distinct roles for histone chaperones in the deposition of Htz1 in chromatin. *Bioscience Reports*, 34(5), pp.559–573. Available at: <http://dx.doi.org/10.1042/bsr20140092>.

- Liu, L., Query, C.C. & Konarska, M.M., 2007. Opposing classes of prp8 alleles modulate the transition between the catalytic steps of pre-mRNA splicing. *Nature structural & molecular biology*, 14(6), pp.519–526.
- Liu, Y. et al., 2009. Phosphorylation of the transcription elongation factor Spt5 by yeast Bur1 kinase stimulates recruitment of the PAF complex. *Molecular and cellular biology*, 29(17), pp.4852–4863.
- Loewith, R. et al., 2000. Three yeast proteins related to the human candidate tumor suppressor p33(ING1) are associated with histone acetyltransferase activities. *Molecular and cellular biology*, 20(11), pp.3807–3816.
- Lõoke, M., Kristjuhan, K. & Kristjuhan, A., 2011. Extraction of genomic DNA from yeasts for PCR-based applications. *BioTechniques*, 50(5), pp.325–328.
- Love, M.I., Huber, W. & Anders, S., 2014. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome biology*, 15(12), p.550.
- Luk, E. et al., 2010. Stepwise Histone Replacement by SWR1 Requires Dual Activation with Histone H2A.Z and Canonical Nucleosome. *Cell*, 143(5), pp.725–736.
- Mackereth, C.D. et al., 2011. Multi-domain conformational selection underlies pre-mRNA splicing regulation by U2AF. *Nature*, 475(7356), pp.408–411.
- Makarov, E.M. et al., 2002. Small nuclear ribonucleoprotein remodeling during catalytic activation of the spliceosome. *Science*, 298(5601), pp.2205–2208.
- Malagon, F. et al., 2004. Genetic interactions of DST1 in *Saccharomyces cerevisiae* suggest a role of TFIIIS in the initiation-elongation transition. *Genetics*, 166(3), pp.1215–1227.
- Mapendano, C.K. et al., 2010. Crosstalk between mRNA 3' End Processing and Transcription Initiation. *Molecular cell*, 40(3), pp.410–422.
- Margaritis, T. et al., 2012. Two distinct repressive mechanisms for histone 3 lysine 4 methylation through promoting 3'-end antisense transcription. *PLoS genetics*, 8(9), p.e1002952.
- Martinez-Rucobo, F.W. et al., 2015. Molecular Basis of Transcription-Coupled Pre-mRNA Capping. *Molecular cell*, 58(6), pp.1079–1089.
- Martinkova, K. et al., 2002. Functional mapping of *Saccharomyces cerevisiae* Prp45 identifies the SNW domain as essential for viability. *Journal of biochemistry*, 132(4), pp.557–563.
- Matangkasombut, O. & Buratowski, S., 2003. Different sensitivities of bromodomain factors 1 and 2 to histone H4 acetylation. *Molecular cell*, 11(2), pp.353–363.
- Meneghini, M.D., Wu, M. & Madhani, H.D., 2003. Conserved Histone Variant H2A.Z Protects Euchromatin from the Ectopic Spread of Silent Heterochromatin. *Cell*, 112(5), pp.725–736.
- Meyer, M. et al., 2011. Deciphering 3' ss Selection in the Yeast Genome Reveals an RNA Thermosensor that Mediates Alternative Splicing. *Molecular cell*, 43(6), pp.1033–1039.
- Minocha, R. et al., 2018. Mud2 functions in transcription by recruiting the Prp19 and TREX complexes to transcribed genes. *Nucleic acids research*, 46(18), p.9890.

- Misteli, T. & Spector, D.L., 1999. RNA polymerase II targets pre-mRNA splicing factors to transcription sites in vivo. *Molecular cell*, 3(6), pp.697–705.
- Mizuguchi, G. et al., 2004. ATP-driven exchange of histone H2AZ variant catalyzed by SWR1 chromatin remodeling complex. *Science*, 303(5656), pp.343–348.
- Moabbi, A.M. et al., 2012. Role for gene looping in intron-mediated enhancement of transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(22), pp.8505–8510.
- Moehle, E.A. et al., 2012. The yeast SR-like protein Npl3 links chromatin modification to mRNA processing. *PLoS genetics*, 8(11), p.e1003101.
- Morillon, A. et al., 2005. Dynamic lysine methylation on histone H3 defines the regulatory phase of gene transcription. *Molecular cell*, 18(6), pp.723–734.
- Mount, S.M. et al., 1983. The U1 small nuclear RNA-protein complex selectively binds a 5' splice site in vitro. *Cell*, 33(2), pp.509–518.
- Murray, S. et al., 2001. Phosphorylation of the RNA polymerase II carboxy-terminal domain by the Bur1 cyclin-dependent kinase. *Molecular and cellular biology*, 21(13), pp.4089–4096.
- Murr, R. et al., 2007. Orchestration of chromatin-based processes: mind the TRRAP. *Oncogene*, 26(37), pp.5358–5372.
- Nakamura, K. et al., 2011. Regulation of homologous recombination by RNF20-dependent H2B ubiquitination. *Molecular cell*, 41(5), pp.515–528.
- Neubauer, G. et al., 1998. Mass spectrometry and EST-database searching allows characterization of the multi-protein spliceosome complex. *Nature genetics*, 20(1), pp.46–50.
- Neugebauer, K.M., Stolk, J.A. & Roth, M.B., 1995. A conserved epitope on a subset of SR proteins defines a larger family of Pre-mRNA splicing factors. *The Journal of cell biology*, 129(4), pp.899–908.
- Neves, L.T. et al., 2017. The histone variant H2A.Z promotes efficient cotranscriptional splicing in *S. cerevisiae*. *Genes & development*, 31(7), pp.702–717.
- Ng, H.H., Robert, F., et al., 2003. Targeted recruitment of Set1 histone methylase by elongating Pol II provides a localized mark and memory of recent transcriptional activity. *Molecular cell*, 11(3), pp.709–719.
- Ng, H.H., Dole, S. & Struhl, K., 2003. The Rtf1 component of the Paf1 transcriptional elongation complex is required for ubiquitination of histone H2B. *The Journal of biological chemistry*, 278(36), pp.33625–33628.
- Nguyen, T.H.D. et al., 2016. Cryo-EM structure of the yeast U4/U6.U5 tri-snRNP at 3.7 Å resolution. *Nature*, 530(7590), pp.298–302.
- Nishino, Y. et al., 2012. Human mitotic chromosomes consist predominantly of irregularly folded nucleosome fibres without a 30-nm chromatin structure. *The EMBO journal*, 31(7), pp.1644–1653.
- Nislow, C., Ray, E. & Pillus, L., 1997. SET1, a yeast member of the trithorax family, functions in transcriptional silencing and diverse cellular processes. *Molecular biology of the cell*, 8(12), pp.2421–2436.

- Nissen, K.E. et al., 2017. The histone variant H2A.Z promotes splicing of weak introns. *Genes & development*, 31(7), pp.688–701.
- Ogawa, N. & Oshima, Y., 1990. Functional domains of a positive regulatory protein, PHO4, for transcriptional control of the phosphatase regulon in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and cellular biology*, 10(5), pp.2224–2236.
- Ohi, M.D. et al., 2002. Proteomics analysis reveals stable multiprotein complexes in both fission and budding yeasts containing Myb-related Cdc5p/Cef1p, novel pre-mRNA splicing factors, and snRNAs. *Molecular and cellular biology*, 22(7), pp.2011–2024.
- Ozer, G., Luque, A. & Schlick, T., 2015. The chromatin fiber: multiscale problems and approaches. *Current opinion in structural biology*, 31, pp.124–139.
- Papamichos-Chronakis, M. et al., 2011. Global Regulation of H2A.Z Localization by the INO80 Chromatin-Remodeling Enzyme Is Essential for Genome Integrity. *Cell*, 144(2), pp.200–213.
- Papamichos-Chronakis, M., Krebs, J.E. & Peterson, C.L., 2006. Interplay between Ino80 and Swr1 chromatin remodeling enzymes regulates cell cycle checkpoint adaptation in response to DNA damage. *Genes & development*, 20(17), pp.2437–2449.
- Pérez-Valle, J. & Vilardell, J., 2012. Intronic features that determine the selection of the 3' splice site. *Wiley interdisciplinary reviews. RNA*, 3(5), pp.707–717.
- Perriman, R. et al., 2003. ATP requirement for Prp5p function is determined by Cus2p and the structure of U2 small nuclear RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(24), pp.13857–13862.
- Perriman, R. & Ares, M., Jr, 2000. ATP can be dispensable for prespliceosome formation in yeast. *Genes & development*, 14(1), pp.97–107.
- Phair, R.D. & Misteli, T., 2000. High mobility of proteins in the mammalian cell nucleus. *Nature*, 404(6778), pp.604–609.
- Pokholok, D.K. et al., 2005. Genome-wide map of nucleosome acetylation and methylation in yeast. *Cell*, 122(4), pp.517–527.
- Pope, B.D. et al., 2014. Topologically associating domains are stable units of replication-timing regulation. *Nature*, 515(7527), pp.402–405.
- Potoyan, D.A. & Papoian, G.A., 2012. Regulation of the H4 tail binding and folding landscapes via Lys-16 acetylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(44), pp.17857–17862.
- Prathapam, T., Kühne, C. & Banks, L., 2002. Skip interacts with the retinoblastoma tumor suppressor and inhibits its transcriptional repression activity. *Nucleic acids research*, 30(23), pp.5261–5268.
- Prevorovský, M. et al., 2016. Workflow for Genome-Wide Determination of Pre-mRNA Splicing Efficiency from Yeast RNA-seq Data. *BioMed research international*, 2016, p.4783841.
- Price, A.M. et al., 2014. An unanticipated early function of DEAD-box ATPase Prp28 during commitment to splicing is modulated by U5 snRNP protein Prp8. *RNA*, 20(1), pp.46–60.

- Protacio, R.U. et al., 2000. Effects of histone tail domains on the rate of transcriptional elongation through a nucleosome. *Molecular and cellular biology*, 20(23), pp.8866–8878.
- Qiu, H., Hu, C. & Hinnebusch, A.G., 2009. Phosphorylation of the Pol II CTD by KIN28 enhances BUR1/BUR2 recruitment and Ser2 CTD phosphorylation near promoters. *Molecular cell*, 33(6), pp.752–762.
- Quinlan, A.R., 2014. BEDTools: The Swiss-Army Tool for Genome Feature Analysis. *Current protocols in bioinformatics / editorial board, Andreas D. Baxevanis ... [et al.]*, 47, pp.11.12.1–34.
- Raisner, R.M. et al., 2005. Histone variant H2A.Z marks the 5' ends of both active and inactive genes in euchromatin. *Cell*, 123(2), pp.233–248.
- Ranjan, A. et al., 2013. Nucleosome-free Region Dominates Histone Acetylation in Targeting SWR1 to Promoters for H2A.Z Replacement. *Cell*, 154(6), pp.1232–1245.
- Rauhut, R. et al., 2016. Molecular architecture of the *Saccharomyces cerevisiae* activated spliceosome. *Science*, 353(6306), pp.1399–1405.
- Ricci, M.A. et al., 2015. Chromatin fibers are formed by heterogeneous groups of nucleosomes in vivo. *Cell*, 160(6), pp.1145–1158.
- Roberts, G.C. et al., 1998. Co-transcriptional commitment to alternative splice site selection. *Nucleic acids research*, 26(24), pp.5568–5572.
- Robzyk, K., Recht, J. & Osley, M.A., 2000. Rad6-dependent ubiquitination of histone H2B in yeast. *Science*, 287(5452), pp.501–504.
- Rodriguez, C.R. et al., 2000. Kin28, the TFIIF-associated carboxy-terminal domain kinase, facilitates the recruitment of mRNA processing machinery to RNA polymerase II. *Molecular and cellular biology*, 20(1), pp.104–112.
- Roguev, A. et al., 2001. The *Saccharomyces cerevisiae* Set1 complex includes an Ash2 homologue and methylates histone 3 lysine 4. *The EMBO journal*, 20(24), pp.7137–7148.
- Rosonina, E. et al., 2014. Threonine-4 of the budding yeast RNAP II CTD couples transcription with Htz1-mediated chromatin remodeling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(33), pp.11924–11931.
- Ruiz-García, A.B. et al., 1997. Gcn5p is involved in the acetylation of histone H3 in nucleosomes. *FEBS letters*, 403(2), pp.186–190.
- Rutz, B. & Séraphin, B., 2000. A dual role for BBP/ScSF1 in nuclear pre-mRNA retention and splicing. *The EMBO journal*, 19(8), pp.1873–1886.
- Rutz, B. & Séraphin, B., 1999. Transient interaction of BBP/ScSF1 and Mud2 with the splicing machinery affects the kinetics of spliceosome assembly. *RNA*, 5(6), pp.819–831.
- Santisteban, M.S., Hang, M. & Smith, M.M., 2011. Histone Variant H2A.Z and RNA Polymerase II Transcription Elongation. *Molecular and cellular biology*, 31(9), pp.1848–1860.
- Santisteban, M.S., Kalashnikova, T. & Mitchell Smith, M., 2000. Histone H2A.Z Regulates Transcription and Is Partially Redundant with Nucleosome Remodeling Complexes. *Cell*, 103(3), pp.411–422.

- Santos-Rosa, H. et al., 2002. Active genes are tri-methylated at K4 of histone H3. *Nature*, 419(6905), pp.407–411.
- Sayani, S. & Chanfreau, G.F., 2012. Sequential RNA degradation pathways provide a fail-safe mechanism to limit the accumulation of unspliced transcripts in *Saccharomyces cerevisiae*. *RNA*, 18(8), pp.1563–1572. Available at: <http://dx.doi.org/10.1261/rna.033779.112>.
- Schacherer, J. et al., 2007. Genome-wide analysis of nucleotide-level variation in commonly used *Saccharomyces cerevisiae* strains. *PloS one*, 2(3), p.e322.
- Schneider, J. et al., 2005. Molecular regulation of histone H3 trimethylation by COMPASS and the regulation of gene expression. *Molecular cell*, 19(6), pp.849–856.
- Schroeder, S.C. et al., 2000. Dynamic association of capping enzymes with transcribing RNA polymerase II. *Genes & development*, 14(19), pp.2435–2440.
- Schwer, B., 2008. A conformational rearrangement in the spliceosome sets the stage for Prp22-dependent mRNA release. *Molecular cell*, 30(6), pp.743–754.
- Schwer, B. & Gross, C.H., 1998. Prp22, a DExH-box RNA helicase, plays two distinct roles in yeast pre-mRNA splicing. *The EMBO journal*, 17(7), pp.2086–2094.
- S raphin, B., Kretzner, L. & Rosbash, M., 1988. A U1 snRNA:pre-mRNA base pairing interaction is required early in yeast spliceosome assembly but does not uniquely define the 5' cleavage site. *The EMBO journal*, 7(8), pp.2533–2538.
- Shen, H. et al., 2008. Distinct activities of the DExD/H-box splicing factor hUAP56 facilitate stepwise assembly of the spliceosome. *Genes & development*, 22(13), pp.1796–1803.
- Shen, Y. et al., 2012. A map of the cis-regulatory sequences in the mouse genome. *Nature*, 488(7409), pp.116–120.
- Shieh, G.S. et al., 2011. H2B ubiquitylation is part of chromatin architecture that marks exon-intron structure in budding yeast. *BMC genomics*, 12, p.627.
- Shilatifard, A., 2008. Molecular implementation and physiological roles for histone H3 lysine 4 (H3K4) methylation. *Current opinion in cell biology*, 20(3), pp.341–348.
- Sims, R.J., 3rd et al., 2007. Recognition of trimethylated histone H3 lysine 4 facilitates the recruitment of transcription postinitiation factors and pre-mRNA splicing. *Molecular cell*, 28(4), pp.665–676.
- Singer, M.S. et al., 1998. Identification of high-copy disruptors of telomeric silencing in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 150(2), pp.613–632.
- Sinha, D. & Shogren-Knaak, M.A., 2010. Role of direct interactions between the histone H4 Tail and the H2A core in long range nucleosome contacts. *The Journal of biological chemistry*, 285(22), pp.16572–16581.
- Soares, L.M. et al., 2017. Determinants of Histone H3K4 Methylation Patterns. *Molecular cell*, 68(4), pp.773–785.e6.
- Spiluttini, B. et al., 2010. Splicing-independent recruitment of U1 snRNP to a transcription unit in living cells. *Journal of cell science*, 123(Pt 12), pp.2085–2093.
- Spingola, M. et al., 1999. Genome-wide bioinformatic and molecular analysis of introns in *Saccharomyces cerevisiae*. *RNA*, 5(2), pp.221–234.

- Spingola, M. & Ares, M., Jr, 2000. A yeast intronic splicing enhancer and Nam8p are required for Mer1p-activated splicing. *Molecular cell*, 6(2), pp.329–338.
- Staley, J.P. & Guthrie, C., 1999. An RNA switch at the 5' splice site requires ATP and the DEAD box protein Prp28p. *Molecular cell*, 3(1), pp.55–64.
- Stark, M.R. et al., 2015. Dramatically reduced spliceosome in *Cyanidioschyzon merolae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(11), pp.E1191–200.
- Steinmetz, L.M. et al., 2002. Dissecting the architecture of a quantitative trait locus in yeast. *Nature*, 416(6878), pp.326–330.
- Stevens, S.W. et al., 2002. Composition and functional characterization of the yeast spliceosomal penta-snRNP. *Molecular cell*, 9(1), pp.31–44.
- Storici, F. & Resnick, M.A., 2006. The Delitto Perfetto Approach to In Vivo Site-Directed Mutagenesis and Chromosome Rearrangements with Synthetic Oligonucleotides in Yeast. In *Methods in Enzymology*. pp. 329–345.
- Strahl, B.D. et al., 2002. Set2 is a nucleosomal histone H3-selective methyltransferase that mediates transcriptional repression. *Molecular and cellular biology*, 22(5), pp.1298–1306.
- Suka, N. et al., 2001. Highly specific antibodies determine histone acetylation site usage in yeast heterochromatin and euchromatin. *Molecular cell*, 8(2), pp.473–479.
- Sun, Z.-W. & Allis, C.D., 2002. Ubiquitination of histone H2B regulates H3 methylation and gene silencing in yeast. *Nature*, 418(6893), pp.104–108.
- Tardiff, D.F., Lacadie, S.A. & Rosbash, M., 2006. A genome-wide analysis indicates that yeast pre-mRNA splicing is predominantly posttranscriptional. *Molecular cell*, 24(6), pp.917–929.
- Tardiff, D.F. & Rosbash, M., 2006. Arrested yeast splicing complexes indicate stepwise snRNP recruitment during in vivo spliceosome assembly. *RNA*, 12(6), pp.968–979.
- Taverna, S.D. et al., 2006. Yng1 PHD finger binding to H3 trimethylated at K4 promotes NuA3 HAT activity at K14 of H3 and transcription at a subset of targeted ORFs. *Molecular cell*, 24(5), pp.785–796.
- Thatcher, T.H. & Gorovsky, M.A., 1994. Phylogenetic analysis of the core histones H2A, H2B, H3, and H4. *Nucleic acids research*, 22(2), pp.174–179.
- Thornton, J.L. et al., 2014. Context dependency of Set1/COMPASS-mediated histone H3 Lys4 trimethylation. *Genes & development*, 28(2), pp.115–120.
- Tong, A.H.Y. & Boone, C., 2006. Synthetic genetic array analysis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods in molecular biology*, 313, pp.171–192.
- Tramantano, M. et al., 2016. Constitutive turnover of histone H2A.Z at yeast promoters requires the preinitiation complex. *eLife*, 5. Available at: <http://dx.doi.org/10.7554/elife.14243>.
- Trujillo, K.M. & Osley, M.A., 2012. A role for H2B ubiquitylation in DNA replication. *Molecular cell*, 48(5), pp.734–746.
- Tu, S. et al., 2007. Identification of histone demethylases in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of biological chemistry*, 282(19), pp.14262–14271.

- Uhler, J.P., Hertel, C. & Svejstrup, J.Q., 2007. A role for noncoding transcription in activation of the yeast PHO5 gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(19), pp.8011–8016.
- Van Oss, S.B. et al., 2016. The Histone Modification Domain of Paf1 Complex Subunit Rtf1 Directly Stimulates H2B Ubiquitylation through an Interaction with Rad6. *Molecular cell*, 64(4), pp.815–825.
- Venkatasubrahmanyam, S. et al., 2007. Genome-wide, as opposed to local, antisilencing is mediated redundantly by the euchromatic factors Set1 and H2A.Z. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(42), pp.16609–16614.
- Vitaliano-Prunier, A. et al., 2008. Ubiquitylation of the COMPASS component Swd2 links H2B ubiquitylation to H3K4 trimethylation. *Nature cell biology*, 10(11), pp.1365–1371.
- Walter, D., Matter, A. & Fahrenkrog, B., 2014. Loss of histone H3 methylation at lysine 4 triggers apoptosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS genetics*, 10(1), p.e1004095.
- Wang, A., Kurdistani, S.K. & Grunstein, M., 2002. Requirement of Hos2 histone deacetylase for gene activity in yeast. *Science*, 298(5597), pp.1412–1414.
- Wang, X. et al., 2010. A large intrinsically disordered region in SKIP and its disorder-order transition induced by PPIL1 binding revealed by NMR. *The Journal of biological chemistry*, 285(7), pp.4951–4963.
- Wan, R. et al., 2016. Cryo-EM structure of the Catalytic Step I spliceosome (C complex) at 3.4 angstrom resolution. Available at: <http://dx.doi.org/10.2210/pdb5gmk/pdb>.
- Wan, R. et al., 2016. Structure of a yeast catalytic step I spliceosome at 3.4 Å resolution. *Science*, 353(6302), pp.895–904.
- Warner, M.H., Roinick, K.L. & Arndt, K.M., 2007. Rtf1 is a multifunctional component of the Paf1 complex that regulates gene expression by directing cotranscriptional histone modification. *Molecular and cellular biology*, 27(17), pp.6103–6115.
- Watanabe, S. et al., 2013. A Histone Acetylation Switch Regulates H2A.Z Deposition by the SWR-C Remodeling Enzyme. *Science*, 340(6129), pp.195–199.
- Will, C.L. & Luhrmann, R., 2010. Spliceosome Structure and Function. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 3(7), pp.a003707–a003707.
- Wilmes, G.M. et al., 2008. A Genetic Interaction Map of RNA-Processing Factors Reveals Links between Sem1/Dss1-Containing Complexes and mRNA Export and Splicing. *Molecular cell*, 32(5), pp.735–746.
- Winzeler, E.A. et al., 2003. Genetic diversity in yeast assessed with whole-genome oligonucleotide arrays. *Genetics*, 163(1), pp.79–89.
- Wood, A., Krogan, N.J., et al., 2003. Bre1, an E3 ubiquitin ligase required for recruitment and substrate selection of Rad6 at a promoter. *Molecular cell*, 11(1), pp.267–274.
- Wood, A. et al., 2005. The Bur1/Bur2 complex is required for histone H2B monoubiquitination by Rad6/Bre1 and histone methylation by COMPASS. *Molecular cell*, 20(4), pp.589–599.
- Wood, A., Schneider, J., et al., 2003. The Paf1 complex is essential for histone monoubiquitination by the Rad6-Bre1 complex, which signals for histone methylation by COMPASS and Dot1p. *The Journal of biological chemistry*, 278(37), pp.34739–34742.

- Wu, W.-H. et al., 2009. N terminus of Swr1 binds to histone H2AZ and provides a platform for subunit assembly in the chromatin remodeling complex. *The Journal of biological chemistry*, 284(10), pp.6200–6207.
- Wu, W.-H. et al., 2005. Swc2 is a widely conserved H2AZ-binding module essential for ATP-dependent histone exchange. *Nature structural & molecular biology*, 12(12), pp.1064–1071.
- Wu, Z. et al., 2017. Rad6-Bre1-mediated H2B ubiquitination regulates telomere replication by promoting telomere-end resection. *Nucleic acids research*, 45(6), pp.3308–3322.
- Wu, Z. et al., 2018. Rad6-Bre1 mediated histone H2Bub1 protects uncapped telomeres from exonuclease Exo1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *DNA repair*, 72, pp.64–76.
- Wyce, A. et al., 2007. H2B ubiquitylation acts as a barrier to Ctk1 nucleosomal recruitment prior to removal by Ubp8 within a SAGA-related complex. *Molecular cell*, 27(2), pp.275–288.
- Xiao, T. et al., 2005. Histone H2B ubiquitylation is associated with elongating RNA polymerase II. *Molecular and cellular biology*, 25(2), pp.637–651.
- Xu, C. et al., 2006. Solution structure of human peptidyl prolyl isomerase-like protein 1 and insights into its interaction with SKIP. *The Journal of biological chemistry*, 281(23), pp.15900–15908.
- Xu, D. & Friesen, J.D., 2001. Splicing factor slt1 lp and its involvement in formation of U2/U6 helix II in activation of the yeast spliceosome. *Molecular and cellular biology*, 21(4), pp.1011–1023.
- Xu, Y. et al., 2012. Histone H2A.Z Controls a Critical Chromatin Remodeling Step Required for DNA Double-Strand Break Repair. *Molecular Cell*, 48(5), pp.723–733. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2012.09.026>.
- Xu, Z. et al., 2016. H2B ubiquitination regulates meiotic recombination by promoting chromatin relaxation. *Nucleic acids research*, 44(20), pp.9681–9697.
- Yamashita, K., Shinohara, M. & Shinohara, A., 2004. Rad6-Bre1-mediated histone H2B ubiquitylation modulates the formation of double-strand breaks during meiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(31), pp.11380–11385.
- Yan, C. et al., 2016. Structure of a yeast activated spliceosome at 3.5 Å resolution. *Science*, 353(6302), pp.904–911.
- Yan, C. et al., 2015. Structure of a yeast spliceosome at 3.6-angstrom resolution. *Science*, 349(6253), pp.1182–1191.
- Yan, C. et al., 2017. Structure of a yeast step II catalytically activated spliceosome. *Science*, 355(6321), pp.149–155.
- Yan, C., Wan, R. & Shi, Y., 2019. Molecular Mechanisms of pre-mRNA Splicing through Structural Biology of the Spliceosome. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 11(1). Available at: <http://dx.doi.org/10.1101/cshperspect.a032409>.
- Yen, K., Vinayachandran, V. & Pugh, B.F., 2013. SWR-C and INO80 chromatin remodelers recognize nucleosome-free regions near +1 nucleosomes. *Cell*, 154(6), pp.1246–1256.

- Yvert, G. et al., 2003. Trans-acting regulatory variation in *Saccharomyces cerevisiae* and the role of transcription factors. *Nature genetics*, 35(1), pp.57–64.
- Zeng, M. et al., 2016. CRL4(Wdr70) regulates H2B monoubiquitination and facilitates Exo1-dependent resection. *Nature communications*, 7, p.11364.
- Zhang, C. et al., 2003. Nuclear coactivator-62 kDa/Ski-interacting protein is a nuclear matrix-associated coactivator that may couple vitamin D receptor-mediated transcription and RNA splicing. *The Journal of biological chemistry*, 278(37), pp.35325–35336.
- Zhang, C. et al., 2001. Ternary complexes and cooperative interplay between NCoA-62/Ski-interacting protein and steroid receptor coactivators in vitamin D receptor-mediated transcription. *The Journal of biological chemistry*, 276(44), pp.40614–40620.
- Zhang, H. et al., 2004. The Yaf9 component of the SWR1 and NuA4 complexes is required for proper gene expression, histone H4 acetylation, and Htz1 replacement near telomeres. *Molecular and cellular biology*, 24(21), pp.9424–9436.
- Zhang, H., Roberts, D.N. & Cairns, B.R., 2005. Genome-wide dynamics of Htz1, a histone H2A variant that poises repressed/basal promoters for activation through histone loss. *Cell*, 123(2), pp.219–231.
- Zhang, W. et al., 1998. Essential and redundant functions of histone acetylation revealed by mutation of target lysines and loss of the Gcn5p acetyltransferase. *The EMBO journal*, 17(11), pp.3155–3167.
- Zheng, C. et al., 2005. Salt-dependent Intra- and Internucleosomal Interactions of the H3 Tail Domain in a Model Oligonucleosomal Array. *The Journal of biological chemistry*, 280(39), pp.33552–33557.
- Zhou, S. et al., 2000. SKIP, a CBF1-associated protein, interacts with the ankyrin repeat domain of NotchIC To facilitate NotchIC function. *Molecular and cellular biology*, 20(7), pp.2400–2410.

10. Příloha

Publikace: **Workflow for Genome-Wide Determination of Pre-mRNA Splicing Efficiency from RNA-seq Data.** BioMed Research International. 2016, p.4783841

Hindawi Publishing Corporation
BioMed Research International
Volume 2016, Article ID 4783841, 9 pages
<http://dx.doi.org/10.1155/2016/4783841>



Research Article

Workflow for Genome-Wide Determination of Pre-mRNA Splicing Efficiency from Yeast RNA-seq Data

Martin Převorovský, Martina Hálová, Kateřina Abbrhánová, Jiří Libus, and Petr Folk

Department of Cell Biology, Faculty of Science, Charles University, Viničná 7, 128 43 Prague 2, Czech Republic

Correspondence should be addressed to Martin Převorovský; prevorov@natur.cuni.cz

Received 8 September 2016; Accepted 2 November 2016

Academic Editor: Guohua Xiao

Copyright © 2016 Martin Převorovský et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Pre-mRNA splicing represents an important regulatory layer of eukaryotic gene expression. In the simple budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*, about one-third of all mRNA molecules undergo splicing, and splicing efficiency is tightly regulated, for example, during meiotic differentiation. *S. cerevisiae* features a streamlined, evolutionarily highly conserved splicing machinery and serves as a favourite model for studies of various aspects of splicing. RNA-seq represents a robust, versatile, and affordable technique for transcriptome interrogation, which can also be used to study splicing efficiency. However, convenient bioinformatics tools for the analysis of splicing efficiency from yeast RNA-seq data are lacking. We present a complete workflow for the calculation of genome-wide splicing efficiency in *S. cerevisiae* using strand-specific RNA-seq data. Our pipeline takes sequencing reads in the FASTQ format and provides splicing efficiency values for the 5' and 3' splice junctions of each intron. The pipeline is based on up-to-date open-source software tools and requires very limited input from the user. We provide all relevant scripts in a ready-to-use form. We demonstrate the functionality of the workflow using RNA-seq datasets from three spliceosome mutants. The workflow should prove useful for studies of yeast splicing mutants or of regulated splicing, for example, under specific growth conditions.

1. Introduction

In eukaryotes, coding parts of genes, the exons, are interrupted by noncoding parts, the introns. The process through which introns are removed and exons are joined together is called splicing. It occurs via two consecutive transesterification reactions which are catalysed by the spliceosome, a large dynamic ribonucleoprotein complex composed of five snRNP particles (U1, U2, U4/U6, and U5) and other associated protein complexes, like the Nineteen Complex (NTC in yeast; CDC5L in mammals) (reviewed in [1]). Splicing must occur very precisely as even a single nucleotide shift may lead to a frameshift, which could cause many disorders, including cancer [2, 3]. Therefore, regulation of splicing has an important role in gene expression.

Introns are defined by core sequences comprising the 5' splice site, branch site, and the 3' splice site. In metazoans, additional sequences are needed for recruiting various trans-acting regulatory factors, which modulate the binding of spliceosome subunits and splice site choice and efficiency,

deciding on the splicing outcome. This is important especially for alternative splicing (reviewed in [4]).

In contrast to higher eukaryotes, whose genes typically contain multiple short exons alternating with introns up to several kilobases long [5], gene structure in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae* is much simpler. Only five percent of the almost 6000 yeast genes contain introns, usually just one [6]. However, the intron containing genes are very highly expressed. As a result, about one-third of all transcripts are spliced [7]. The consensus sequences of the yeast core spliceosome signals are well defined (GUAUGU for the 5' splice site, UACUAAC for the branch site with the branching A in bold, and AG for the 3' splice site) [6]. Also, there are only few cases of alternative splicing in budding yeast (reviewed in [8]), and regulation of splicing efficiency plays a more prominent role, for example, during meiosis [9] or under environmental stress [10, 11]. For example, the constitutively transcribed intron containing genes *REC107*, *AMA1*, *SPO22*, and *MER3* are efficiently spliced and processed to form functional mRNAs only during meiosis, when

TABLE 1: RNA-seq datasets used in this study.

| Genotype | ArrayExpress acc. number ^a | ENA acc. number ^b | Read length (nt) | Total reads | Reads with MAPQ ≥ 10 | % reads with MAPQ ≥ 10 |
|----------------------|---------------------------------------|------------------------------|------------------|-------------|-------------------------|---------------------------|
| WT | E-MTAB-5149 | ERR1709739 | 100 | 27 789 829 | 25 329 092 | 91,2% |
| | | ERR1709740 | 100 | 22 000 062 | 20 402 556 | 92,7% |
| <i>prp45</i> (1-169) | E-MTAB-5149 | ERR1709737 | 100 | 27 842 215 | 25 491 566 | 91,6% |
| | | ERR1709738 | 100 | 25 156 639 | 23 359 541 | 92,9% |
| WT | E-GEOD-44219 | SRX233529 | 100 | 21 012 048 | 17 127 536 | 81,5% |
| <i>prp4-1</i> | E-GEOD-44219 | SRX233535 | 100 | 17 142 559 | 14 457 015 | 84,3% |
| WT | E-GEOD-49966 | SRR953535 | 101 | 35 203 753 | 7 655 225 | 21,8% |
| <i>prp40-1</i> | E-GEOD-49966 | SRR953537 | 101 | 17 326 529 | 3 596 304 | 20,8% |

^aAccession number for the ArrayExpress database (<https://www.ebi.ac.uk/arrayexpress/>).

^bAccession number for the European Nucleotide Archive (<http://www.ebi.ac.uk/ena>).

the Mer1 splicing factor is expressed [9, 12–14]. Also, various environmental stresses can lead to differential changes in splicing efficiency in specific groups of genes: amino acid starvation inhibits splicing of the ribosomal protein genes, while ethanol stress has no effect on this group of genes but alters splicing in another group [10, 11].

The yeast spliceosome consists of ~90 proteins, that is, around half of the proteins identified in the human spliceosome. However, nearly all of the yeast spliceosome components have counterparts in human. Therefore, it was suggested that the *S. cerevisiae* spliceosome represents an evolutionarily conserved core of the splicing machinery. Accordingly, many of the human-specific spliceosomal proteins are needed for the regulation of alternative splicing, a feature almost missing in the budding yeast [15]. This, together with the ease of cultivation and genetic manipulation, led to the establishment of the budding yeast as a favourite model for studying the basic mechanisms of pre-mRNA splicing.

To study the influence of genetic perturbations or environmental conditions on splicing, it is important to quantify the splicing efficiency. Splicing efficiency is traditionally calculated as the amount of mRNA divided by the amount of pre-mRNA. The gold standard for mRNA and pre-mRNA quantification is the use of quantitative PCR (RT-qPCR) with primers spanning exon-intron and exon-exon junctions (e.g., [16]). However, this approach is feasible for measuring mRNA and pre-mRNA levels for only a limited number of genes. By contrast, ultrahigh-throughput sequencing of RNA (RNA-seq) allows comprehensive splicing analysis at the genome-wide scale [17–19]. There are multiple paradigms for calculating splicing efficiency from RNA-seq data, which are based on comparing sequencing read counts from intronic and exonic regions or also take into account exon-exon junction reads (transreads). The methods also vary in the length of the window considered (e.g., 25 bp around a splice site versus a whole exon) [17, 18, 20–24]. RNA-seq is a simple, robust, and affordable technique and there is now a wealth of publicly available RNA-seq datasets [25, 26]. Together, this makes RNA-seq a convenient method for genome-wide determination of splicing efficiency, although the bioinformatics analyses involved might be challenging for nonspecialists. Here, we present a complete and documented up-to-date

workflow for semiautomatic calculation of genome-wide splicing efficiencies from strand-specific RNA-seq data in *S. cerevisiae*.

2. Materials and Methods

2.1. RNA-seq Datasets. Sequencing reads from strand-specific transcriptome profiling of splicing mutants (*prp45*(1-169), *prp4-1*, and *prp40-1*) and their corresponding wild-type *S. cerevisiae* strains [17, 24] were downloaded from the European Nucleotide Archive (<http://www.ebi.ac.uk/ena>) in FASTQ format (more information about the various file formats used in this study can be found at <https://genome.ucsc.edu/FAQ/FAQformat.html>) and experiment metadata were obtained from ArrayExpress (<https://www.ebi.ac.uk/arrayexpress/>). The relevant database accession numbers are given in Table 1. Importantly, to simplify downstream analyses, only “read 1” FASTQ files were used from paired-end sequencing datasets.

The pipeline requires that strand-specific sequencing read data are used (true for most currently generated RNA-seq datasets). As pervasive antisense transcription has been reported in many eukaryotic organisms, including yeasts [27], strand specificity of sequencing reads helps to separate the contributions of potential overlapping sense/antisense transcripts.

Sequencing read quality and potential contamination by adapters and/or PCR primers was checked with FastQC 0.11.5 (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>). All datasets were found suitable for further analyses. However, if needed, contaminating and low-quality sequences can be filtered and/or trimmed using tools such as Trimmomatic [28].

2.2. Read Mapping. Reads were aligned to *S. cerevisiae* genome (Ensembl R64-1-1) with the fast, splice-aware HISAT2 aligner (version 2.0.4) using *S. cerevisiae* genome index containing transcript structures [29]. Minimum and maximum intron length parameters were set to 20 and 10000 nt, respectively. More details on HISAT2 parameter settings can be found in the “workflow.sh” shell script in the Supplementary Material available online at <http://dx.doi.org/10.1155/2016/4783841>.

Subsequently, samtools 1.3.1 were used to filter reads by their mapping quality score (MAPQ ≥ 10) to keep only reads that aligned unambiguously to a single locus and to sort and index the resulting BAM files [30]. Read mapping was also assessed visually in the IGV browser 2.3.69 [31].

We also tried aligning reads from the *PRP45*-related datasets with TopHat2 [32], the widely used predecessor of HISAT2. Compared to TopHat2, the HISAT2 alignment step was ~2-fold faster, and the mapping supported identification of ~11% more transreads and calculation of splicing efficiencies for ~4% more splice sites.

2.3. Splice Site Identification and Counting of Transreads. Putative splicing events were detected by regtools 0.2.0 (<https://regtools.readthedocs.io/en/latest/>). These tools look for presumed transreads (reads spanning exon-exon junction) in BAM files, compile a table of all identified putative splice sites and their characteristics, and provide the counts of transreads spanning these splice sites. Minimum and maximum intron length parameters were set to 20 and 10000 nt, respectively. Detected splice sites were also annotated and classified as known or novel using regtools and *S. cerevisiae* genome annotation (Ensembl R64-1-1) in GTF format. The output from regtools was further processed and coordinates of bases at the very 5' and 3' ends of each known intron were extracted (into BED format) by a custom R script (R version 3.3.1, <https://www.r-project.org/>). See the "workflow.sh" and "junctions.R" scripts in the Supplementary Material for more details.

2.4. Determination of 5' and 3' Intron End Coverage. Read coverage of the very first (5' end) and the very last (3' end) base of each known intron was determined from all BAM files in parallel using bedtools 2.25.0 (bedtools multicov) [33]. It is critical to set the *-split* parameter to avoid including transreads in the intronic read counts. It is also important to correctly set the *-s/-S* parameters according to the sequencing library preparation protocol employed to ensure that only reads mapped to the "sense" strand will be counted (see the "workflow.sh" script in the Supplementary Material).

2.5. Splicing Efficiency Calculation. The method for splicing efficiency calculation was derived from the "3' splice site ratio" method described in [20]. For each intron, splicing efficiency was determined separately for the 5' splice site and 3' splice site using the following formulas:

$$\text{Efficiency } 5' = \frac{\text{transread count}}{5' \text{ intron end first base coverage}}, \quad (1)$$

$$\text{Efficiency } 3' = \frac{\text{transread count}}{3' \text{ intron end last base coverage}}.$$

Transreads only arise from spliced transcripts and thus reflect directly the abundance of mRNA molecules in which the particular intron has been spliced out. By definition, transreads must cover at least the very last base of exon X and the very first base of exon X + 1. To match this single-base resolution while counting intronic reads, only those reads

covering the very first (for 5' splice site) and the very last (for 3' splice site) base of the corresponding intron are counted. This allows direct comparison of pre-mRNA and spliced mRNA molecule levels (an approach most similar to the RT-qPCR gold standard; see below) and separate calculation of splicing efficiencies at the 5' splice site and 3' splice site of each intron, reflecting the efficiencies of the two splicing steps.

We note that, for some genes, our method may use only a fraction of all available intronic reads (e.g., for mitochondrial genes with long introns). Importantly, the introns of some genes harbour nested snoRNAs or are predicted to contain potential stable structures, suggesting the presence of so far uncharacterised nested noncoding RNAs. It was shown that such introns can be maintained in the cell after splicing [34], potentially affecting the determination of splicing efficiency when sequencing reads along the whole intron are considered.

Depending on the sequencing library size, strain genotype, or cultivation conditions, many introns typically have very low read coverage, which might produce unreliable splicing efficiency data. Therefore, in the final spreadsheet, we do not report splicing efficiency values for junctions with read counts below an arbitrary threshold of 5 reads for both transread count and intron end read count. Users may change this threshold if required; see the "efficiency.R" script in the Supplementary Material for more details.

2.6. Yeast Strains and Cell Cultivation. Wild-type (BY4741-MATa *his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0*) and the *prp45*(1-169) mutant (AVY17-MATa *his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 prp45*(1-169)-3-HA::NatMX6) strains were grown in the YPAD medium (2% peptone, 1% yeast extract, 0.01% adenine, and 2% glucose) at 30°C to 1.5×10^7 cells/mL. Two millilitres of each culture was harvested by centrifugation and cell pellets were stored at -80°C.

2.7. RNA Isolation, Reverse Transcription, and RT-qPCR Analysis. Total RNA was isolated with the MasterPure Yeast RNA Isolation Kit (Epicentre) according to the manufacturer's protocol. cDNA was prepared from 2 μg of the total RNA using the RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific) with random hexamer primers. RT-qPCR was performed using LightCycler 480 II (Roche). Each reaction (total volume of 10 μL) was performed in triplicate and consisted of 5 μL of the MESA GREEN qPCR MasterMix Plus for SYBR Assay, No-ROX (Eurogentec), 4 μL of 100-fold diluted cDNA, and a pair of primers 0.3 mM each (for sequences, see the Supplementary Material). Primer pairs were designed to specifically amplify either the spliced or the unspliced transcripts of the *ECM33*, *ACT1*, *COF1*, *RPL22A*, and *RPL22B* genes. Amplicons from unspliced transcripts covered the 3' splice junction in *ECM33*, while the 5' splice junction was covered in the other four genes. Four to six biological replicates were analysed for each gene, and the *TOM22* and *SPT15* genes were used as reference controls. Relative pre-mRNA and mRNA quantities were calculated by the $\Delta\Delta C_t$ method [35].

3. Results and Discussion

3.1. Pipeline for Determination of Splicing Efficiency. We have put together a workflow for calculating splicing efficiency of each intron from standard RNA-seq data in *S. cerevisiae* (Figure 1). The pipeline consists mostly of established open-source tools for manipulation and analysis of next-generation sequencing data (FastQC, HISAT2, samtools, regtools, and bedtools) and simple custom scripts (Linux shell and R). All scripts including parameter settings for all tools are available in the Supplementary Material.

Briefly, after input quality control (FastQC), reads are mapped into *S. cerevisiae* reference genome (HISAT2, [29]) and filtered, keeping only uniquely mapped reads (samtools, [30]; MAPQ ≥ 10). Positions of splice junctions (both known and novel) and transread counts for these junctions are extracted (regtools). Read coverage of the 5' and 3' intron end base is determined (bedtools, [33]) and splicing efficiency calculated for each intron at both 5' and 3' splice junction, corresponding to the efficiency of the first and the second step of splicing, respectively.

The description of folder structure and content, both required before starting the analysis and produced during the analysis, is given in the file “folders_readme” in the Supplementary Material. Users need to supply genome sequence (in FASTA format), annotation (in GTF format), and HISAT2 genome index containing transcript structures (in the “genome” folder). A ready-made *S. cerevisiae* genome index can be downloaded from the HISAT2 website (“genome_tran”; <https://ccb.jhu.edu/software/hisat2/>). Users further need to supply RNA-seq reads in FASTQ format (in the “FASTQ” folder); the pipeline is designed for single-end, strand-specific sequencing data. Depending on the protocol for sequencing library preparation that was used, users might need to adjust strandness-related parameters for HISAT2 and bedtools (see the Materials and Methods and the “workflow.sh” file in the Supplementary Material) to obtain correct read counts and splicing efficiency values.

The main outputs of the pipeline are

- (1) a table (CSV format) of transread counts from all samples for known splice junctions (folder “transreads”; file “splice_junctions_coverage_known.csv”; note that only junctions of expressed genes for which transreads were detected are reported in all analyses);
- (2) tables of read coverage from all samples for 5' and 3' terminal bases of known introns (folder “introns”; files “introns_known_5ss.bed.counts.csv” and “introns_known_3ss.bed.counts.csv”);
- (3) tables of read threshold-filtered splicing efficiencies in all samples calculated separately for 5' and 3' splice sites of known introns (folder “efficiency”; files “splicing_efficiency_5ss.conf.csv” and “splicing_efficiency_3ss.conf.csv”).

Users can also define a set of sample (FASTQ filename) pairs to be compared (e.g., mutant versus wild type; see the “efficiency.R” script in the Supplementary Material). The pipeline then produces a table of “relative” splicing efficiencies (folder

“efficiency”; files “relative_splicing_efficiency_5ss.conf.csv” and “relative_splicing_efficiency_3ss.conf.csv”) and scatter-plot images (folder “images”; PDF format; see Figure 2 for an example).

Multiple approaches have been used in the past to determine splicing efficiency from yeast RNA-seq data, for example, [17, 18, 21, 24]. However, the bioinformatics tools used are often outdated now in terms of speed of processing and their abilities to work with split reads (transreads). Also, the complete workflow, including all relevant scripts, is usually not provided. By contrast, the pipeline presented in this study is based upon the latest tools with advanced capabilities for fast and accurate split read processing, suitable for studies of splicing efficiency [29, 30, 33]. The pipeline also allows convenient processing of multiple FASTQ files (samples) with very limited input from the user required. In case of the *PRP45*-related datasets mentioned below, ~55 million 100 nt reads were processed by the pipeline in 38 minutes on a standard desktop PC (quad-core AMD A8-3870 APU CPU with 8 GB RAM) running 64-bit Ubuntu 16.04.

While the scripts provided in the Supplementary Material are customized for analysis of *S. cerevisiae* RNA-seq data, the pipeline can be easily adapted for other yeast species by providing the corresponding genome sequence, genome annotation, and genome index (built using hisat2-build [29]) files and altering the relevant filename variables in the “workflow.sh” script accordingly. The Supplementary Material contains one such example adaptation of the pipeline for the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*.

3.2. Analysis of Splicing Efficiency in Spliceosome Mutants. As we are primarily interested in studying altered splicing patterns in various spliceosome mutants, we selected three publicly available RNA-seq datasets for *S. cerevisiae* spliceosome mutants, which show global reductions in splicing efficiency, to demonstrate the function of our workflow. All datasets contain samples with roughly similar amounts of sequencing reads (~17–35 million) of very similar length (~100 nt) but differ markedly in data quality in terms of the percentage of uniquely mappable reads (Table 1).

The first example dataset is focused on Prp45, an essential splicing factor and a component of the so-called NTC-related complex [36]. Based on cryo-EM structural information, Prp45 stabilizes the catalytic centre of the spliceosome through interactions with many proteins and with all three spliceosomal snRNAs [37]. Cells bearing the C-terminally truncated *prp45*(1-169) allele are temperature-sensitive and have deformed shapes [38]. We analysed two biological replicates of RNA-seq data for wild-type and *prp45*(1-169) cells grown at permissive temperature (30°C). First, we used the data pooled by genotype and found a global decrease of splicing efficiency in the mutant (Figures 2(a) and 2(b)). Next, we calculated relative splicing efficiencies (i.e., mutant normalized to wild type) in each replicate separately to assess reproducibility. Results for introns with sufficient splice junctions coverage (≥ 5 transreads and ≥ 5 reads covering intron end base) showed good agreement between the two independent replicates (Figures 2(c) and 2(d)). Finally, to validate the results of our pipeline, we used

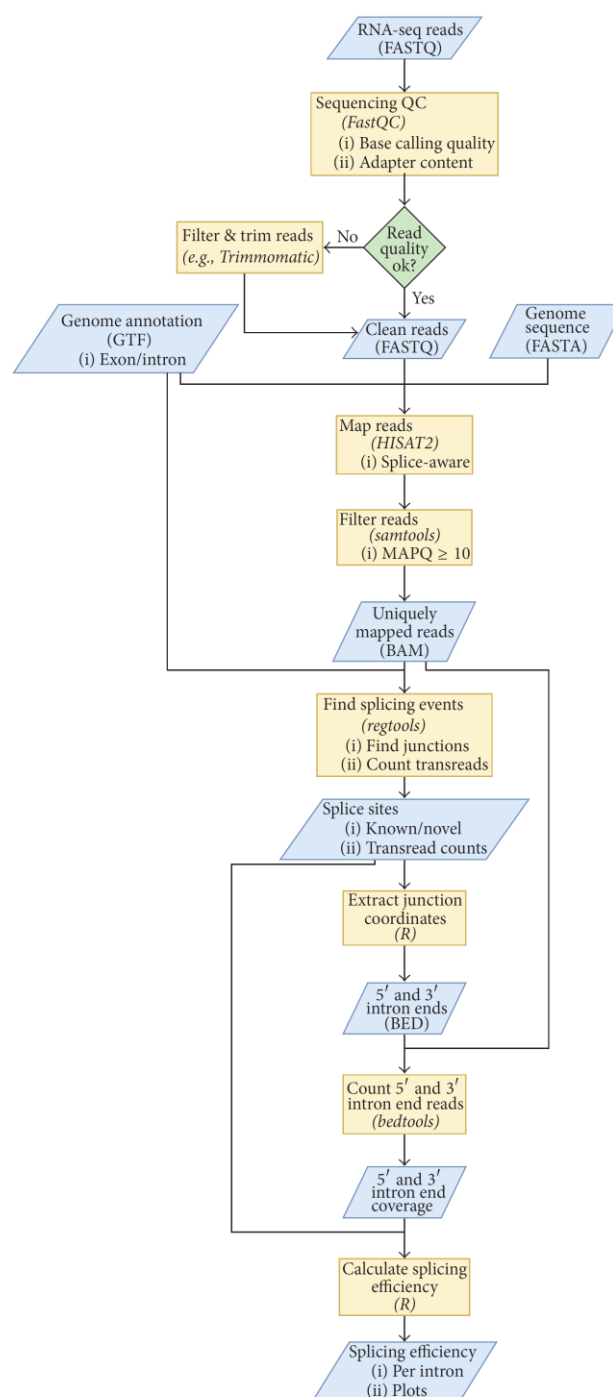


FIGURE 1: Workflow for calculating splicing efficiency from RNA-seq data. Files and datasets are represented by blue parallelograms (file formats given in parentheses), and processing steps are represented by orange rectangles (tool names given in parentheses). Some files/datasets are used repeatedly in several steps of the workflow as signified by multiple flow lines going from these files/datasets. The diagram was created using draw.io (<https://www.draw.io/>).

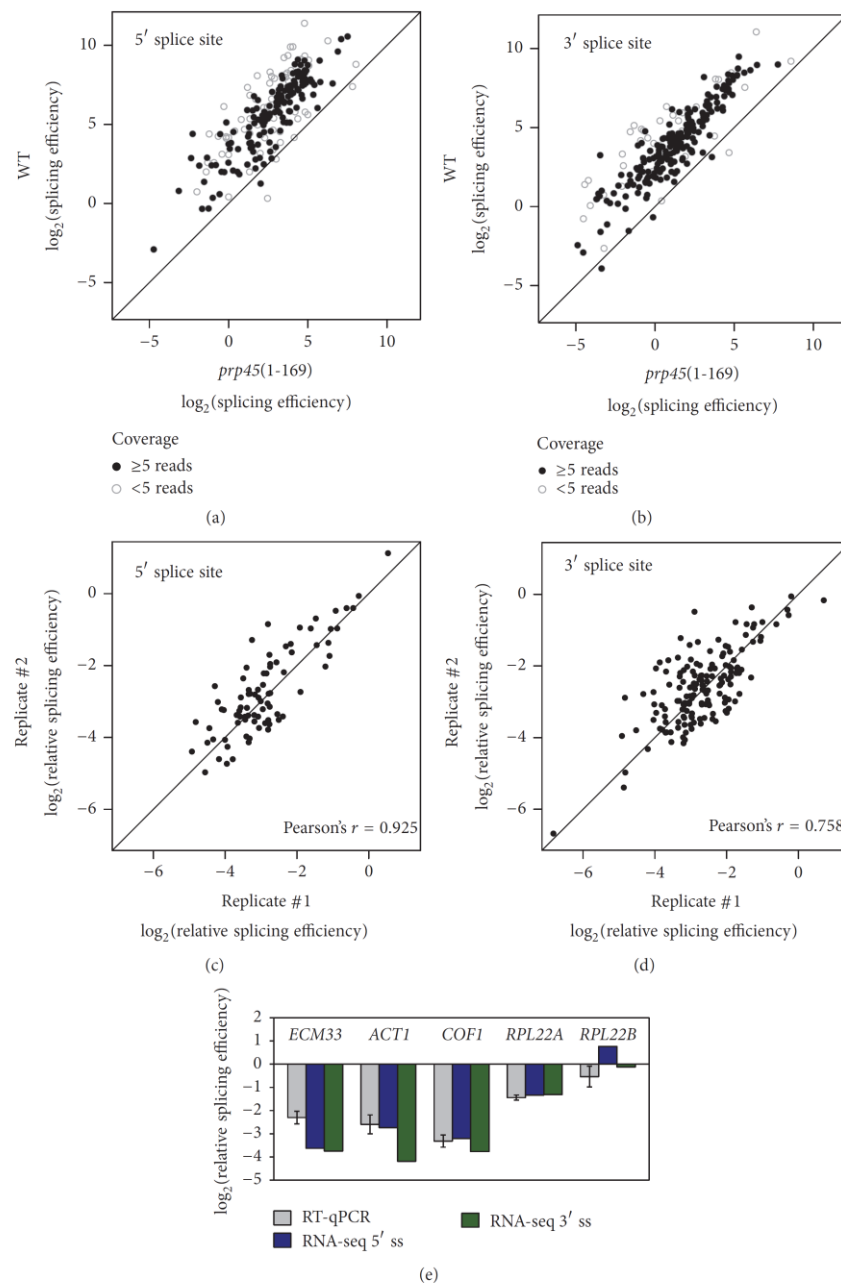


FIGURE 2: Splicing efficiency in the *prp45(1-169)* mutant. Splicing efficiencies for all known introns (for 5' and 3' splice sites separately) were calculated using the pipeline described in Figure 1. (a, b) Results for two pooled biological replicates of the *prp45(1-169)* mutant and its corresponding wild-type strain. Higher values correspond to more efficient splicing. Full circles represent values for introns with sufficient coverage (≥ 5 transreads and ≥ 5 reads covering intron end base); open circles represent low-confidence values for introns with low sequencing read coverage. (c, d) Relative splicing efficiencies (*prp45(1-169)* normalized to wild type) at the 5' and 3' splice sites were calculated for each biological replicate separately. Only introns with sufficient read coverage were considered. Pearson's r values for the two replicates are indicated. (e) Comparison of relative splicing efficiencies at the 5' and 3' splice sites of selected genes calculated from the pooled RNA-seq data with relative splicing efficiencies determined by RT-qPCR (means of 4–6 independent RT-qPCR experiments \pm SD).

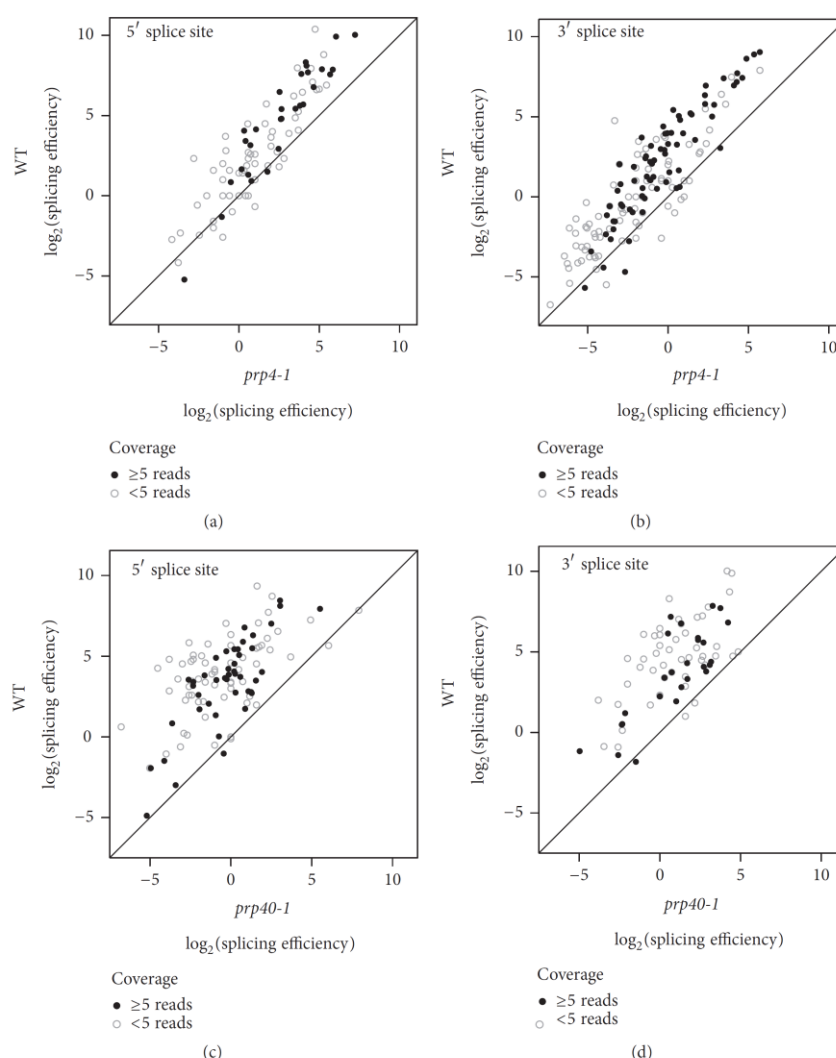


FIGURE 3: Splicing efficiency in the *prp4-1* and *prp40-1* mutants. Splicing efficiencies for all known introns (for 5' and 3' splice sites separately) were calculated using the pipeline described in Figure 1. (a, b) Results for the *prp4-1* mutant and its corresponding wild-type strain [17]. (c, d) Results for the *prp40-1* mutant and its corresponding wild-type strain [24]. Higher values correspond to more efficient splicing. Full circles represent values for introns with sufficient coverage (≥5 transreads and ≥5 reads covering intron end base); open circles represent low-confidence values for introns with low sequencing read coverage.

RT-qPCR to measure the levels of spliced and unspliced transcripts for five selected genes showing various degrees of splicing impairment in the *prp45*(1-169) mutant RNA-seq dataset. Reassuringly, the splicing efficiencies calculated by our pipeline were concordant with those determined by RT-qPCR, pointing to possible differential requirements for Prp45 in pre-mRNA splicing of specific genes (Figure 2(e)).

Next, we analysed data for Prp4, a structural component of the U4/U6 di- and U4/U6-U5 tri-snRNP particles [39, 40].

The *prp4-1* temperature-sensitive allele blocks U4 snRNP dissociation during the catalytic activation of the spliceosome [41, 42]. Using splicing-sensitive microarrays, it was shown that this mutation causes a genome-wide splicing defect even at the permissive temperature of 26°C [43]. We used the *prp4-1* RNA-seq dataset from [17] and we confirmed the global impairment of splicing efficiency in this mutant at permissive temperature (Figures 3(a) and 3(b)). However, for a number of introns, splicing efficiency could not be

convincingly determined (especially at the 5' splice site) due to low read coverage at the splice junctions. This was unexpected since the *prp4-1* sequencing library sizes and mappability were comparable to the *prp45*(1-169) dataset (Table 1). Furthermore, the whole distribution of splicing efficiencies at the 3' splice site (for both *prp4-1* and its wild-type control) was shifted compared to the other two splicing mutants we analysed. Visual inspection of mapped *prp4-1* reads revealed decreasing coverage towards 5' ends of genes, where introns are typically located in *S. cerevisiae*, suggesting possible problems with RNA sample preparation and/or processing.

The third example relates to Prp40, a component of the U1 snRNP particle [44]. Through interactions with many spliceosome subunits and with the phosphorylated C-terminal domain of the RNA polymerase II, the Prp40 protein is important for cotranscriptional spliceosome assembly (reviewed in [45]). The *prp40-1* temperature-sensitive mutant [44] exerts a global splicing defect when shifted to nonpermissive temperature [24], which we confirmed by running the published RNA-seq dataset through our pipeline (Figures 3(c) and 3(d)). It should be noted that this dataset had poor mappability (Table 1) and yielded relatively low read coverage, decreasing the number of junctions for which splicing efficiency could be calculated convincingly.

Thus, these three proof-of-principle scenarios demonstrated that our workflow is able to recapitulate previously identified genome-wide decreases in splicing efficiency using RNA-seq data. The results also highlight a critical requirement for sufficient sequencing library quality and size for successful analysis.

4. Conclusions

We present a complete bioinformatics workflow for determining splicing efficiency in the budding yeast *S. cerevisiae* using data produced by the simple and affordable RNA-seq technique. Starting with strand-specific sequencing reads in the FASTQ format, our pipeline is able to calculate splicing efficiency at the 5' and 3' splice junctions of each intron, with very limited input required from the user. All relevant scripts are provided in a documented and ready-to-use form. The workflow should prove useful for studies of yeast splicing mutants or of regulated splicing, for example, under various growth conditions.

Competing Interests

The authors declare that there are no competing interests regarding the publication of this paper.

Acknowledgments

This work was supported by the Czech Science Foundation Grant 14-19002S and Charles University Grants SVV 260310, UNCE 204013, and GAUK 8214.

References

- [1] C. L. Will and R. Lührmann, "Spliceosome structure and function," *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, vol. 3, no. 7, pp. 1–23, 2011.
- [2] A. J. Ward and T. A. Cooper, "The pathobiology of splicing," *Journal of Pathology*, vol. 220, no. 2, pp. 152–163, 2010.
- [3] R. K. Singh and T. A. Cooper, "Pre-mRNA splicing in disease and therapeutics," *Trends in Molecular Medicine*, vol. 18, no. 8, pp. 472–482, 2012.
- [4] Z. Wang and C. B. Burge, "Splicing regulation: from a parts list of regulatory elements to an integrated splicing code," *RNA*, vol. 14, no. 5, pp. 802–813, 2008.
- [5] M. Deutsch and M. Long, "Intron-exon structures of eukaryotic model organisms," *Nucleic Acids Research*, vol. 27, no. 15, pp. 3219–3228, 1999.
- [6] M. Spingola, L. Grate, D. Haussler, and A. Manuel Jr., "Genome-wide bioinformatic and molecular analysis of introns in *Saccharomyces cerevisiae*," *RNA*, vol. 5, no. 2, pp. 221–234, 1999.
- [7] M. Ares, L. Grate, and M. H. Pauling, "A handful of intron-containing genes produces the lion's share of yeast mRNA," *RNA*, vol. 5, no. 9, pp. 1138–1139, 1999.
- [8] F. Kempken, "Alternative splicing in ascomycetes," *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 97, no. 10, pp. 4235–4241, 2013.
- [9] J. Engebrecht, K. Voelkel-Meiman, and G. S. Roeder, "Meiosis-specific RNA splicing in yeast," *Cell*, vol. 66, no. 6, pp. 1257–1268, 1991.
- [10] M. Bergkessel, G. B. Whitworth, and C. Guthrie, "Diverse environmental stresses elicit distinct responses at the level of pre-mRNA processing in yeast," *RNA*, vol. 17, no. 8, pp. 1461–1478, 2011.
- [11] J. A. Pleiss, G. B. Whitworth, M. Bergkessel, and C. Guthrie, "Rapid, transcript-specific changes in splicing in response to environmental stress," *Molecular Cell*, vol. 27, no. 6, pp. 928–937, 2007.
- [12] T. Nakagawa and H. Ogawa, "The *Saccharomyces cerevisiae* MER3 gene, encoding a novel helicase-like protein, is required for crossover control in meiosis," *EMBO Journal*, vol. 18, no. 20, pp. 5714–5723, 1999.
- [13] E. M. Munding, A. H. Igel, L. Shiue, K. M. Dorigi, L. R. Treviño, and M. Ares Jr., "Integration of a splicing regulatory network within the meiotic gene expression program of *Saccharomyces cerevisiae*," *Genes & Development*, vol. 24, no. 23, pp. 2693–2704, 2010.
- [14] C. A. Davis, L. Grate, M. Spingola, and M. Ares Jr., "Test of intron predictions reveals novel splice sites, alternatively spliced mRNAs and new introns in meiotically regulated genes of yeast," *Nucleic Acids Research*, vol. 28, no. 8, pp. 1700–1706, 2000.
- [15] P. Fabrizio, J. Dannenberg, P. Dube et al., "The evolutionarily conserved core design of the catalytic activation step of the yeast spliceosome," *Molecular Cell*, vol. 36, no. 4, pp. 593–608, 2009.
- [16] S. Hao and D. Baltimore, "RNA splicing regulates the temporal order of TNF-induced gene expression," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 110, no. 29, pp. 11934–11939, 2013.
- [17] E. M. Munding, L. Shiue, S. Katzman, J. P. Donohue, and M. Ares, "Competition between pre-mRNAs for the splicing machinery drives global regulation of splicing," *Molecular Cell*, vol. 51, no. 3, pp. 338–348, 2013.

- [18] T. Kawashima, S. Douglass, J. Gabunilas, M. Pellegrini, and G. F. Chanfreau, "Widespread use of non-productive alternative splice sites in *saccharomyces cerevisiae*," *PLoS Genetics*, vol. 10, no. 4, Article ID e1004249, 2014.
- [19] D. A. Bitton, C. Rallis, D. C. Jeffares et al., "LaSSO, a strategy for genome-wide mapping of intronic lariats and branch points using RNA-seq," *Genome Research*, vol. 24, no. 7, pp. 1169–1179, 2014.
- [20] L. Herzel and K. M. Neugebauer, "Quantification of co-transcriptional splicing from RNA-Seq data," *Methods*, vol. 85, pp. 36–43, 2015.
- [21] S. B. Livesay, S. E. Collier, D. A. Bitton, J. Bähler, and M. D. Ohi, "Structural and functional characterization of the N terminus of *Schizosaccharomyces pombe* Cwf10," *Eukaryotic Cell*, vol. 12, no. 11, pp. 1472–1489, 2013.
- [22] C. J. Gridale, L. C. Bowers, E. S. Didier, and N. M. Fast, "Transcriptome analysis of the parasite *Encephalitozoon cuniculi*: an in-depth examination of pre-mRNA splicing in a reduced eukaryote," *BMC Genomics*, vol. 14, no. 1, article 207, 2013.
- [23] G. M. Gould, J. M. Paggi, Y. Guo et al., "Identification of new branch points and unconventional introns in *Saccharomyces cerevisiae*," *RNA*, vol. 22, no. 10, pp. 1522–1534, 2016.
- [24] A. Volanakis, M. Passoni, R. D. Hector et al., "Spliceosome-mediated decay (SMD) regulates expression of nonintronic genes in budding yeast," *Genes and Development*, vol. 27, no. 18, pp. 2025–2038, 2013.
- [25] F. Ozsolak and P. M. Milos, "RNA sequencing: advances, challenges and opportunities," *Nature Reviews Genetics*, vol. 12, no. 2, pp. 87–98, 2011.
- [26] J. A. Reuter, D. V. Spacek, and M. P. Snyder, "High-throughput sequencing technologies," *Molecular Cell*, vol. 58, no. 4, pp. 586–597, 2015.
- [27] T. H. Jensen, A. Jacquier, and D. Libri, "Dealing with pervasive transcription," *Molecular Cell*, vol. 52, no. 4, pp. 473–484, 2013.
- [28] A. M. Bolger, M. Lohse, and B. Usadel, "Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data," *Bioinformatics*, vol. 30, no. 15, pp. 2114–2120, 2014.
- [29] D. Kim, B. Langmead, and S. L. Salzberg, "HISAT: a fast spliced aligner with low memory requirements," *Nature Methods*, vol. 12, no. 4, pp. 357–360, 2015.
- [30] H. Li, B. Handsaker, A. Wysoker et al., "The sequence alignment/map format and SAMtools," *Bioinformatics*, vol. 25, no. 16, pp. 2078–2079, 2009.
- [31] H. Thorvaldsdóttir, J. T. Robinson, and J. P. Mesirov, "Integrative Genomics Viewer (IGV): high-performance genomics data visualization and exploration," *Briefings in Bioinformatics*, vol. 14, no. 2, pp. 178–192, 2013.
- [32] D. Kim, G. Pertea, C. Trapnell, H. Pimentel, R. Kelley, and S. L. Salzberg, "TopHat2: accurate alignment of transcriptomes in the presence of insertions, deletions and gene fusions," *Genome Biology*, vol. 14, no. 4, article R36, 2013.
- [33] A. R. Quinlan and I. M. Hall, "BEDTools: a flexible suite of utilities for comparing genomic features," *Bioinformatics*, vol. 26, no. 6, Article ID btq033, pp. 841–842, 2010.
- [34] K. B. Hooks, S. Naseeb, S. Parker, S. Griffiths-Jones, and D. Delneri, "Novel intronic RNA structures contribute to maintenance of phenotype in *Saccharomyces cerevisiae*," *Genetics*, vol. 203, no. 3, pp. 1469–1481, 2016.
- [35] T. D. Schmittgen and K. J. Livak, "Analyzing real-time PCR data by the comparative C_T method," *Nature Protocols*, vol. 3, no. 6, pp. 1101–1108, 2008.
- [36] M. D. Ohi, A. J. Link, L. Ren, J. L. Jennings, W. H. McDonald, and K. L. Gould, "Proteomics analysis reveals stable multiprotein complexes in both fission and budding yeasts containing Myb-related Cdc5p/Cef1p, novel pre-mRNA splicing factors, and snRNAs," *Molecular and Cellular Biology*, vol. 22, no. 7, pp. 2011–2024, 2002.
- [37] R. Wan, C. Yan, R. Bai, G. Huang, and Y. Shi, "Structure of a yeast catalytic step I spliceosome at 3.4 Å resolution," *Science*, vol. 353, no. 6302, pp. 895–904, 2016.
- [38] O. Gahura, K. Abbrámová, M. Skružný et al., "Prp45 affects Prp22 partition in spliceosomal complexes and splicing efficiency of non-consensus substrates," *Journal of Cellular Biochemistry*, vol. 106, no. 1, pp. 139–151, 2009.
- [39] J. Banroques and J. N. Abelson, "PRP4: a protein of the yeast U4/U6 small nuclear ribonucleoprotein particle," *Molecular and Cellular Biology*, vol. 9, no. 9, pp. 3710–3719, 1989.
- [40] S. P. Bjørn, A. Soltyk, J. D. Beggs, and J. D. Friesen, "PRP4 (RNA4) from *Saccharomyces cerevisiae*: its gene product is associated with the U4/U6 small nuclear ribonucleoprotein particle," *Molecular and Cellular Biology*, vol. 9, no. 9, pp. 3698–3709, 1989.
- [41] L. H. Hartwell, C. S. McLaughlin, and J. R. Warner, "Identification of ten genes that control ribosome formation in yeast," *MGG Molecular & General Genetics*, vol. 109, no. 1, pp. 42–56, 1970.
- [42] L. Ayadi, M. Miller, and J. Banroques, "Mutations within the yeast U4/U6 snRNP protein Prp4 affect a late stage of spliceosome assembly," *RNA*, vol. 3, no. 2, pp. 197–209, 1997.
- [43] T. A. Clark, C. W. Sugnet, and M. Ares Jr., "Genomewide analysis of mRNA processing in yeast using splicing-specific microarrays," *Science*, vol. 296, no. 5569, pp. 907–910, 2002.
- [44] H.-Y. Kao and P. G. Siliciano, "Identification of Prp40, a novel essential yeast splicing factor associated with the U1 small nuclear ribonucleoprotein particle," *Molecular and Cellular Biology*, vol. 16, no. 3, pp. 960–967, 1996.
- [45] S. Becerra, E. Andrés-León, S. Prieto-Sánchez, C. Hernández-Munain, and C. Suñé, "Prp40 and early events in splice site definition," *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, vol. 7, no. 1, pp. 17–32, 2016.

Doplňkový (Supplementary) materiál je dostupný online (<https://www.hindawi.com/journals/bmri/2016/4783841/sup/>) a obsahuje tabulku použitých primerů a anotované skripty nutné pro analýzu účinnosti sestřihu.

Nineteen complex-related factor Prp45 is required for the early stages of cotranscriptional spliceosome assembly

MARTINA HÁLOVÁ, ONDŘEJ GAHURA, MARTIN PŘEVOROVSKÝ, ZDENĚK CIT, MARIAN NOVOTNÝ, ANNA VALENTOVÁ, KATEŘINA ABRHÁMOVÁ, FRANTIŠEK PŮTA, and PETR FOLK

Department of Cell Biology, Faculty of Science, Charles University, 128 00 Prague, Czech Republic

ABSTRACT

Splicing in *S. cerevisiae* has been shown to proceed cotranscriptionally, but the nature of the coupling remains a subject of debate. Here, we examine the effect of nineteen complex-related splicing factor Prp45 (a homolog of SNW1/SKIP) on cotranscriptional splicing. RNA-sequencing and RT-qPCR showed elevated pre-mRNA levels but only limited reduction of spliced mRNAs in cells expressing C-terminally truncated Prp45, Prp45(1–169). Assays with a series of reporters containing the *AMA1* intron with regulatable splicing confirmed decreased splicing efficiency and showed the leakage of unspliced RNAs in *prp45*(1–169) cells. We also measured pre-mRNA accumulation of the meiotic *MER2* gene, which depends on the expression of Mer1 factor for splicing. *prp45*(1–169) cells accumulated approximately threefold higher levels of *MER2* pre-mRNA than WT cells only when splicing was induced. To monitor cotranscriptional splicing, we determined the presence of early spliceosome assembly factors and snRNP complexes along the *ECM33* and *ACT1* genes. We found that *prp45*(1–169) hampered the cotranscriptional recruitment of U2 and, to a larger extent, U5 and NTC, while the U1 profile was unaffected. The recruitment of Prp45(1–169) was impaired similarly to U5 snRNP and NTC. Our results imply that Prp45 is required for timely formation of complex A, prior to stable physical association of U5/NTC with the emerging pre-mRNA substrate. We suggest that Prp45 facilitates conformational rearrangements and/or contacts that couple U1 snRNP-recognition to downstream assembly events.

Keywords: cotranscriptional splicing; spliceosome assembly; nineteen complex; Prp8; RES complex; chromatin immunoprecipitation

INTRODUCTION

Introns are removed from protein-coding transcripts based on the combination of splicing sequences and inputs from other complexes involved in gene expression, all of which need to be interpreted during the splicing process. The spliceosome in budding yeast consists of five conserved U-rich small nuclear RNAs (snRNAs) and almost 100 proteins; the overall architecture as well as most of the splicing factors is conserved in higher eukaryotes (Bessonov et al. 2008; Fabrizio et al. 2009). These snRNAs form the active site of the spliceosome and base pair with transcripts, directly contributing to intron recognition and splicing catalysis (Valadkhan and Jaladat 2010; Hang et al. 2015). Proteins have structural, enzymatic, and regulatory functions (Jurica and Moore 2003; Will and Lührmann 2011) and also support a dynamic interaction network which links splicing with all other stages of gene expression (Alexander and Beggs 2010; Bentley 2014). However, the functioning of this network

and its role in gene expression regulation are still far from understood.

The spliceosome assembles de novo on each intron in a stepwise fashion. Proper execution of the rearrangements required to reach the catalytically competent spliceosome depends on DExD/H ATPases, which couple ATP hydrolysis with structural alterations. Early in assembly, U1 snRNP binds the 5' splice site (5'ss), forming the commitment complex 1 (CC1) and is then joined by Msl5 (branchpoint binding protein; BBP), which recognizes the branch site (Ruby and Abelson 1988; Berglund et al. 1997). Subsequently, Msl5 and its heterodimer partner Mud2 are displaced in favor of U2 snRNP, after which U4/U6.U5 tri-snRNP is incorporated into the splicing complex. U1 snRNP is then exchanged for U6 and U5 snRNPs at 5'ss (see Wang and Burge 2008 and references therein). A complex of Prp19-associated factors (nineteen complex; NTC) together with "NTC-related" factors (Prp17, Prp45, and Prp46, among others) are

Corresponding author: folk@natur.cuni.cz

Article is online at <http://www.rnajournal.org/cgi/doi/10.1261/rna.061986.117>.

© 2017 Hálková et al. This article is distributed exclusively by the RNA Society for the first 12 months after the full-issue publication date (see <http://rnajournal.cshlp.org/site/misc/terms.xhtml>). After 12 months, it is available under a Creative Commons License (Attribution-NonCommercial 4.0 International), as described at <http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>.

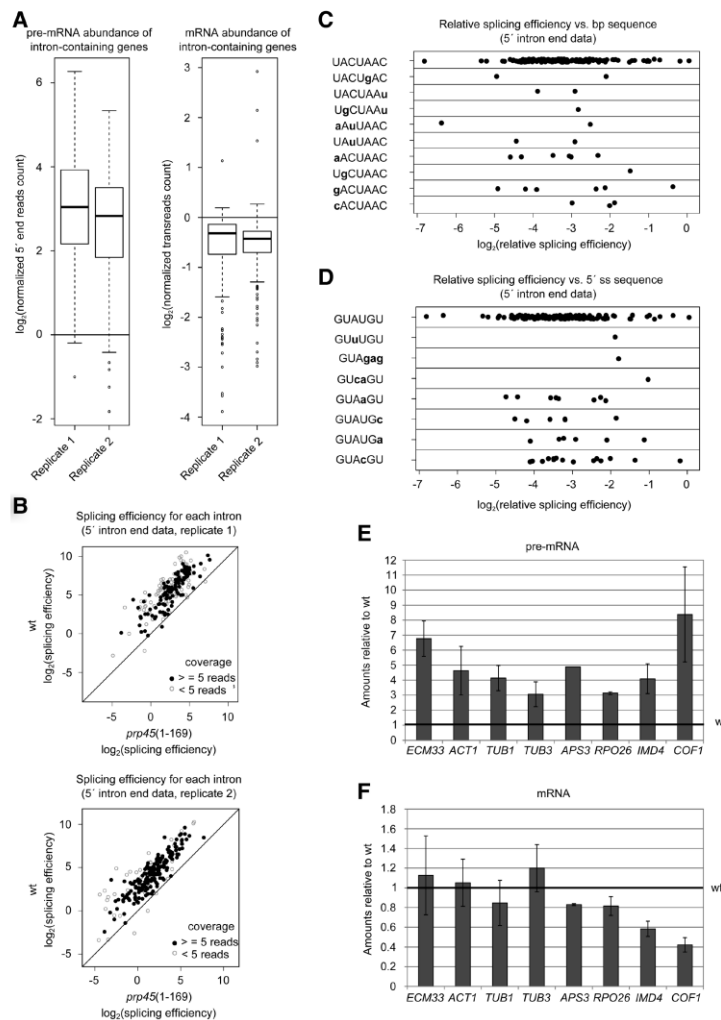


FIGURE 1. Impairment of Prp45 function leads to pre-mRNA accumulation. (A–C) Transcriptome analysis of *prp45*(1–169) cells in comparison with WT in two biological replicates. (A) pre-mRNA is accumulated in the *prp45* mutant (left panel), while the mRNA levels of intron-containing genes are affected only to a limited extent (right panel). The bottom and top of the box represent the second and third quartiles, respectively; the line represents the median. Whiskers extend up to 1.5× of the interquartile range. (B) The overall relative splicing efficiency is impaired in *prp45*(1–169) cells. However, this drop in relative splicing efficiency does not show any tendency with respect to the branch point (C) or 5' ss sequence (D). Graphs C and D show results from one biological replicate. Ratios of mutant/WT splicing efficiencies are plotted. (E,F) RT-qPCR quantification of splicing of selected genes. Spliced (E) and unspliced (F) transcripts were quantified by RT-qPCR and normalized to *TOM22*. Data are expressed relative to WT levels. Error bars represent standard deviations (SD) of at least three biological experiments.

the defining intronic *cis*-acting features. There was no correlation between relative splicing efficiency in the mutant and branch point to 3' ss distance, overall intron length, transcript abundance (transreads), or ORF length (data not shown). Apparently, longer pre-mRNA-mediated interactions of the

(pre)spliceosome with RNA polymerase II (RNA Pol II; on genes with long introns) or more RNA Pol II complexes (on highly expressed genes) were not able to compensate for the deficient assembly process. To verify the RNA-seq results, we measured the levels of unspliced precursors and spliced mRNAs of several endogenous genes by RT-qPCR. We confirmed a three- to sixfold accumulation of all pre-mRNAs tested in *prp45*(1–169) cells (Fig. 1E,F).

Our data set also contained transreads corresponding to unannotated alternatively spliced RNAs as reported previously (Volanakis et al. 2013; Kawashima et al. 2014; Schreiber et al. 2015). In agreement with the earlier reports, these isoforms represented a minor proportion of spliced RNAs of the particular gene (typically <5%). We detected 60 such previously published alternative splice isoforms, 36 of which were less abundant in the *prp45* mutant in comparison to WT (0.5–0.1-fold change; data not shown). It seems that these low-frequency alternative splicing events are more sensitive to *prp45*(1–169).

Prp45(1–169) causes increased leakage of unspliced reporters

To monitor pre-mRNA accumulation under conditions of regulated splicing, we used a set of *AMA1-CUP1*-based reporter constructs expressed in *cup1Δ* cells (Fig. 2A). *AMA1*, together with the *MER2/REC107*, *MER3/HFM1*, and *SPO22* genes, is spliced efficiently only in meiotic Mer1-expressing cells. Mer1 binds to the intron's splicing enhancer (Spingola and Ares 2000) and facilitates the recruitment of U1 snRNP, Mud2, and U2 snRNP to pre-mRNA (Spingola et al. 2004; Balzer and Henry 2008). In vegetative cells, the splicing of *AMA1* intron-containing reporters can be activated by ectopic expression of Mer1. The reporters provide complementary information: (i) The splicing reporter (SpR)

yields functional Cup1 protein only when spliced; (ii) the export reporter (ExR) is translated to Cup1 only when unspliced; and (iii) the control ExR-AU reporter, which has a modified 5' ss and cannot be spliced, yields Cup1 irrespective of changes in splicing. We also used modified

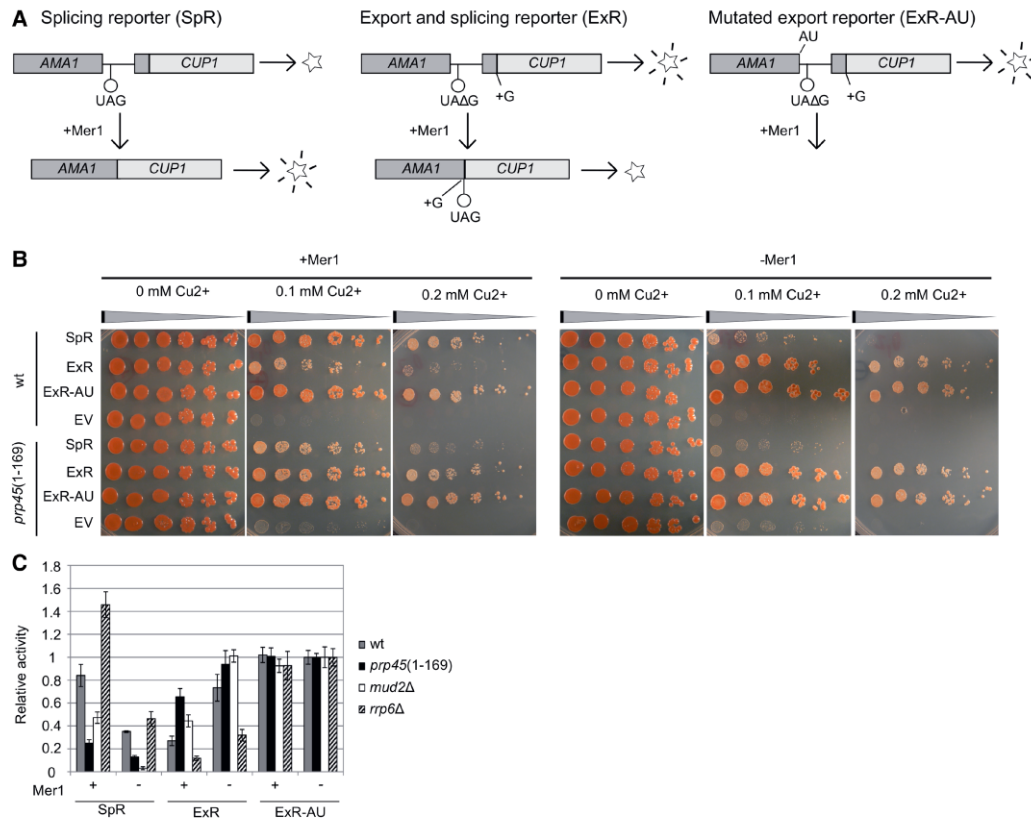


FIGURE 2. Splicing/export reporters indicate a defect before the first transesterification in *prp45(1-169)* cells. (A) Principle of assay using the *AMA1* intron-splicing/export reporter substrates (Scherrer and Spingola 2006). *AMA1* is a meiotic gene; its splicing in vegetative cells depends on the presence of Mer1, a first-step accessory factor. The reporters SpR and ExR contain STOP codons in different positions; their transcripts can be translated to functional proteins (*CUP1* or β -galactosidase) only when spliced (SpR) or not spliced (ExR). The control ExR-AU reporter with mutated 5' splice site (GU to AU) is not recognized by the spliceosome and serves as a control to exclude export-specific defects. (B) *CUP1*-based reporters suggest that *prp45(1-169)* cells are impaired before the first splicing step. Mid-log cells (*cup1Δ* background) expressing the indicated reporter plasmid in the absence or presence of Mer1 were harvested and spotted in eightfold dilution series on media containing increasing concentrations of copper ions. "EV" cells bear an empty vector. Compare the growth of SpR/ExR-expressing cells between *prp45(1-169)* and WT strains in the presence of Mer1 (reporter intron is recognized by the spliceosome) and in its absence. (C) ONPG assay. Mid-log cells expressing the indicated reporter plasmid in the absence or presence of Mer1 were harvested and β -galactosidase activity was measured by ONPG assay. Values were normalized to the activity measured for the ExR-AU reporter in the respective strains in the absence of Mer1. Error bars represent SD of at least three independent experiments.

reporters, which enable the *CUP1* sequence to be replaced by the *lacZ* gene encoding β -galactosidase, to obtain an independent and quantifiable readout of the system (Fig. 2C).

The spot-tests shown in Figure 2B display the differences in reporter-conferred Cu²⁺-resistance between *prp45(1-169)* and WT cells in the presence or absence of Mer1. *prp45(1-169)* cells show impaired splicing in comparison to WT, which is documented in the complementary readouts of SpR and ExR reporters in Mer1-expressing cells. No differences between mutant and WT were observed in the ExR-AU expressing cells, ruling out unrelated splicing defects. The *lacZ* reporters confirmed the results of *CUP1* reporters in *prp45(1-169)* cells (Fig. 2C). The comparison of the

prp45(1-169) mutant with cells that lack Mud2, a protein involved in the early stages of spliceosome assembly (Abovich et al. 1994), revealed a similar pattern of effects. In contrast, the deletion of the nuclear exosome component *RRP6* had an opposite impact on the reporter readouts. The splicing-dependent accumulation of unspliced ExR in *prp45(1-169)* cells is in agreement with a defect preceding the first splicing step. A defect affecting only the second step, i.e., the accumulation of intron-exon 2 lariat, would not influence the ExR signal.

To support the data obtained on reporter genes by the measurement of an endogenous gene, we monitored the splicing of *MER2* by RT-qPCR. We compared *MER2* pre-

mRNA and mRNA levels in WT and *prp45(1–169)* in the absence or presence of Mer1. Splicing proceeded efficiently only in the presence of the splicing activator Mer1, as revealed by high mRNA levels in both strains (Fig. 3). However, the *MER2* pre-mRNA level dropped to about one half in the presence of Mer1 in WT cells, but remained unchanged in *prp45(1–169)* cells. We conclude that the unspliced *MER2* accumulated in *prp45(1–169)* cells, in comparison to WT, only under conditions when the splicing was active. These observations demonstrate that pre-mRNA accumulation in *prp45(1–169)* cells is associated with active splicing.

Truncation of Prp45 decreases its recruitment to intron-containing genes and disrupts cotranscriptional splicing

ChIP assays of tagged spliceosomal components have been successfully used to prove the cotranscriptional character of spliceosome recruitment and splicing in both yeast and mammalian systems (Görnemann et al. 2005; Tardiff and Rosbash 2006; Price et al. 2014). The ChIP signals along the gene can be interpreted as the “time” of the stable association of a particular splicing component (Kotovic et al. 2003; Görnemann et al. 2005). Such experiments as well as single-molecule studies also provide evidence in favor of the stepwise spliceosome assembly model (Hoskins et al. 2011; Carillo Oesterreich et al. 2016). To address the association of Prp45 with intron-containing genes, we prepared two strains expressing either C-terminally HA-tagged Prp45 or Prp45(1–169) and performed ChIP-qPCR analysis using an anti-HA antibody. We designed primer pairs to span *ECM33* and *ACT1* genes with PCR amplicons positioned along the genes (Fig. 4A,J). Prp45 was detected with a maximum signal in the middle of exon 2 (Fig. 4B,K). In contrast, the Prp45(1–169) signal was dramatically lower in all Prp45-positive amplicons, with the tendency to grow gradually toward the 3' end of genes.

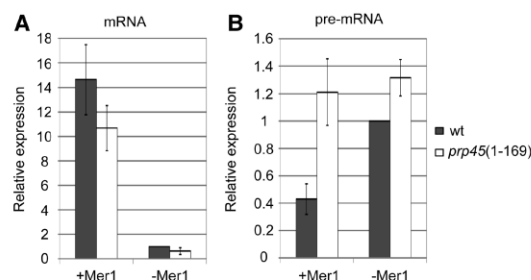


FIGURE 3. *prp45(1–169)* cells accumulate an excess of *MER2* pre-mRNA only when splicing is active. Mer1, a meiotic factor indispensable for *MER2* splicing, was ectopically expressed in vegetative cells. The levels of *MER2* mRNA (A) and pre-mRNA (B) were quantified by RT-qPCR. *prp45(1–169)* cells accumulated more *MER2* precursors than WT cells only when Mer1 was present (see pre-mRNA levels, B) and splicing was active (see mRNA levels, A). Error bars represent SD of three biological experiments.

We used the HA-tagged splicing factors Prp42, Msl5, Mud2, Msl1, Brr2, and Prp19 to monitor the presence of U1 snRNP, BBP, Mud2, U2 snRNP, U5 snRNP, and NTC, respectively, along the *ECM33* and *ACT1* genes. The profiles of U1 snRNP and Msl5/Mud2 showed maxima at the beginning of exon 2, which is in agreement with their roles in the early phases of spliceosome assembly (CC2). The profiles of U2 and U5 snRNPs peaked afterward. The levels of NTC were highest in the second half of exon 2. These data are in agreement with previously reported ChIP analyses (Görnemann et al. 2005; Lacadie and Rosbash 2005). *prp45(1–169)* mutant cells did not show any alterations of either U1 snRNP (Fig. 4D,M) or Mud2 recruitment (Fig. 4F,O). The profile of Msl5 was also similar to WT; we observed only a slightly higher signal from the middle of exon 2 in *prp45* mutants (Fig. 4E,N). In contrast, *prp45(1–169)* hampered the cotranscriptional recruitment of U2 snRNP (Fig. 4G,P), the U5 snRNP component Brr2 (Fig. 4H,Q), and the NTC member Prp19 (Fig. 4I,R). The profile of Prp19 resembled the behavior of Prp45 and showed a similar decrease of recruitment in *prp45(1–169)* cells (Fig. 4B,K). ChIP on *DBP2* gave principally the same data but of lower resolution, because of the short second exon of this gene (data not shown). We also measured RNA Pol II ChIP to complement the spliceosome recruitment data. RNA Pol II was evenly distributed along the genes with slightly lower signals in mutant cells; we did not observe any accumulation of the RNA Pol II signal on the tested intron-containing genes in the *prp45* mutant. Our ChIP results show that Prp45 affects U2 snRNP recruitment and subsequent spliceosome formation events, which supports the conclusion that this factor plays a role in the early stages of spliceosome assembly.

DISCUSSION

Extensive truncation of Prp45 has a mild splicing phenotype in yeast

The RNA-seq data analyzed in this paper document that the *prp45(1–169)* allele resulted in a seven- to eightfold increase of pre-mRNA levels, whereas most of the corresponding mRNAs were only subtly affected. When comparing the relative splicing efficiencies of genes with noncanonical splice sites against the changes induced by the *prp45* mutation, we did not observe any splice site sequence-specific effects (Fig. 1C,D). We examined pre-mRNA and mRNA levels of *AMA1*-based splicing and export reporters, which depend on Mer1 for 5'ss recognition and splicing. In these assays, which measure the proportion of spliced and leaked (unspliced) pre-mRNAs relative to WT, *prp45(1–169)* and *mud2Δ* mutants showed a similar defect, namely a decreased proportion of mRNA-rendered versus leaked pre-mRNA molecules (Fig. 2C). In a separate experiment, we analyzed the pre-mRNA and mRNA levels of the endogenous *MER2*

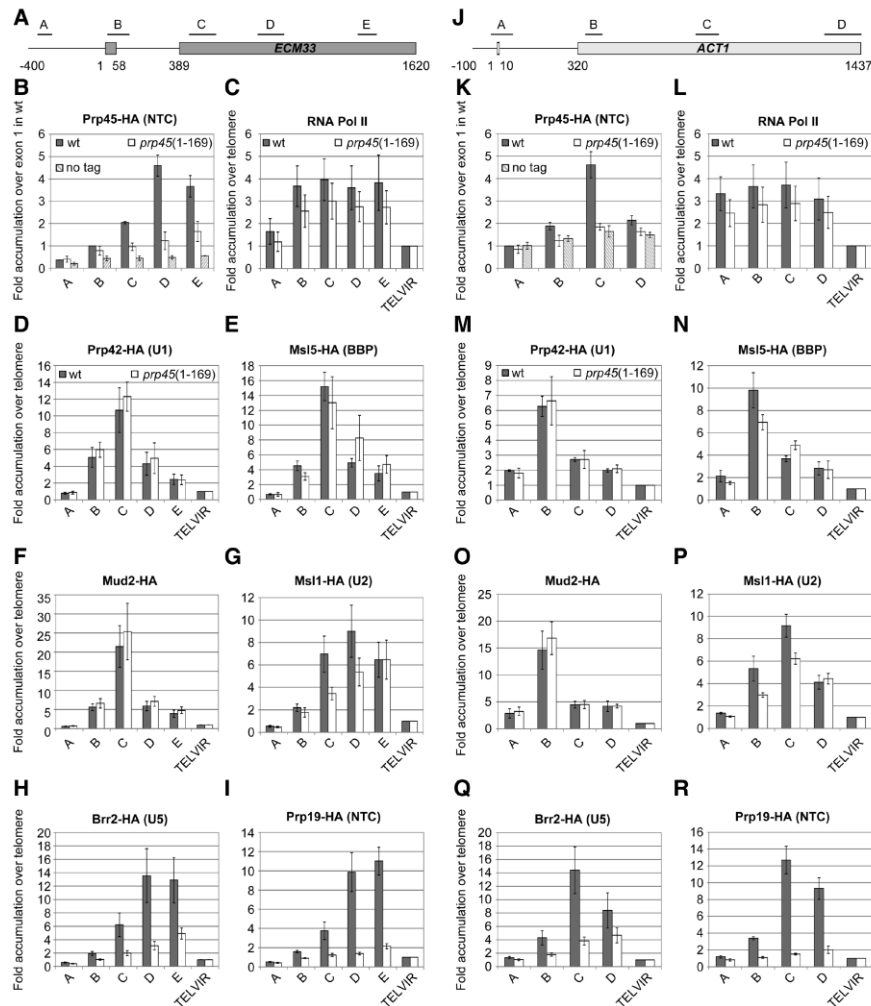


FIGURE 4. *prp45(1–169)* delays cotranscriptional spliceosome assembly. ChIP-qPCR analysis of cotranscriptional recruitment of spliceosomal components was performed on the *ECM33* and *ACT1* genes (A,J; positions of PCR amplicons are indicated). Cells expressing HA-tagged Prp45 or Prp45 (1–169) were used for ChIP-qPCR with the anti-HA antibody. Signals were normalized to input values and expressed as the fold enrichment relative to the signal from exon 1 in the Prp45-HA strain. The strain without the tagged protein served as a negative control (B,K). RNA Pol II ChIP signals were obtained using the anti-Rpb3 antibody. Cotranscriptional spliceosome assembly was monitored via the recruitment of HA-tagged components of commitment complex 1 using HA-tagged Prp42 (D,M), Msl5 (E,N), and Mud2 (F,O). Subsequent stages of spliceosome formation were followed using HA-tagged members of U2 snRNP (Msl1; G,P), U5 snRNP (Brr2; H,Q), and NTC (Prp19; I,R). Signals were normalized to input values and expressed as the fold enrichment relative to the signal obtained from the telomeric region (TEL VIR; graphs C–I and L–R). Error bars represent SD from at least four independent experiments.

gene. *prp45(1–169)* cells accumulated a relative excess of pre-mRNA only when splicing was active (Fig. 3B).

The phenotypes of mutant *PRP45*, i.e., elevated pre-mRNA levels, decreased splicing efficiency of first-step limiting substrates (Gahura et al. 2009), and impaired nuclear retention of pre-mRNA, are similar to factors involved in the early stages of prespliceosome formation, such as cap-binding complex (CBC) or Mud2 (Colot et al. 1996; Rain and

Legrain 1997). *MSL5* (BBP) mutants also affect the splicing of nonconsensus introns and cause leakage of pre-mRNA into the cytoplasm, albeit to a much larger extent than *prp45(1–169)* (Rutz and Séraphin 2000). The early role of the NTC-related component *PRP45* is also supported by the findings of yeast two-hybrid interactions between Snw1, the Prp45/SKIP ortholog in *S. pombe*, and U2AF23, as well as human SKIP and both U2AF65/35 subunits (the

major interaction being with U2AF65) (Ambrozková et al. 2001; Chen et al. 2011). The U2AF65-related protein of yeast, Mud2, has been found to interact with the NTC component Clf1 (Chung et al. 1999). Intriguingly, none of the MS analyses of purified staged spliceosomal complexes have presented an assembly where the U2AF subunits and the NTC-related component Prp45/SKIP were found together (Jurica et al. 2002; Makarov et al. 2002; Ohi et al. 2002; Fabrizio et al. 2009).

The early effects of Prp45 on the association of U2 snRNP with pre-mRNA

We used HA-tagged versions of yeast splicing factors and Prp45 to gain information on the impact of its truncation on cotranscriptional splicing. Prp45(1–169) severely delayed cotranscriptional recruitment of a subset of splicing subcomplexes to *ACT1* and *ECM33* pre-mRNAs. Because catalysis can occur after the stable association of tri-snRNP and NTC, our results suggest that splicing in *prp45*(1–169) cells proceeds only after RNA Pol II reaches the end of the gene. The transcriptome analysis [performed with poly(A)-enriched RNA] shows that splicing is eventually accomplished, albeit post-transcriptionally and with lower efficiency (higher steady-state levels of pre-mRNA). Notably, the *ACT1* gene, where we observed the delay, shows no second-step splicing defect in *prp45*(1–169) cells using *ACT1* reporter-based primer extension assays (Gahura et al. 2009).

Composition analyses of purified splicing complexes using MS indicated that Prp45 was present as part of the NTC-containing spliceosome (i.e., B complex and later stages) (Jurica et al. 2002; Makarov et al. 2002), but not at earlier points of the splicing cycle (CC2 or A complex) (Hartmuth et al. 2002). However, the truncation of Prp45 affected the spliceosome before tri-snRNP, and NTC are observed to be stably associated with pre-mRNA. The purification schemes used in these MS studies may have precluded the isolation of transiently associating components, including highly flexible Prp45. For example, recent in vitro analysis of human spliceosomes stalled because a mutation in Prp28/DHX8 identified a complex that contained U1, U2, and loosely associated tri-snRNP (called pre-B complex) (Boesler et al. 2016). This particle, which apparently precedes the formation of B complex, evaded identification previously.

Early effects on assembly, i.e., effects preceding the stage when a protein becomes detectable as part of the (pre) spliceosome, have been reported for Prp8, Prp28 (Li et al. 2013; Price et al. 2014), as well as the NTC component Clf1 (Chung et al. 2002; Wang et al. 2003), among others. The mutant form of U5 snRNP-associated DEAD-box ATPase Prp28, Prp28-1, hampers the formation of CC2 complex and subsequent U2 recruitment. Prp28-1 also leads to the delayed dissociation of U1. Importantly, mutations in the bromodomain-like domain of Prp8 are able to suppress both these effects of Prp28-1 (Price et al. 2014). These results

argue that Prp8 must gain access to Prp28 during its ATP-independent role in CC2 formation and/or to U1 snRNP (Li et al. 2013). U5 and Prp8 have been repeatedly found cross-linked to 5' ss during the early phase of splicing, both in yeast (Newman et al. 1995) and in Metazoa (Wyatt et al. 1992; Ast and Weiner 1997). The interaction of Prp8 with 5' ss requires U4 and U6, which suggests that the interacting entity is in the form of tri-snRNP (Maroney et al. 2000). The defect in the cotranscriptional recruitment of U2 snRNP caused by Prp45 truncation bears resemblance to the early effects of Prp8 and Prp28. Intriguingly, Prp45 is found in many contacts with Prp8 (see below).

The dissociation of U1 is uncoupled from downstream binding events in *prp45*(1–169) cells

The profile of U1 was identical for WT and mutant, while the stable association of U2, U5, and NTC was delayed in *prp45*(1–169) cells (U2 < U5 < NTC). This implies that U1 displacement is not coordinated with tri-snRNP binding (U6–5' ss pairing) (Lacadie and Rosbash 2005; Tardiff and Rosbash 2006). Information in the literature suggests that U1 recruitment and dissociation are dependent on many factors, including later-acting ones, such as Prp28 or Prp8 (Price et al. 2014). In cotranscriptional assays, the interaction of U1 with pre-mRNA was extended toward the 3' end of exon 2 in deletion mutants of the cap-binding complex (CBC) (Görnemann et al. 2005) or after U2 snRNA depletion (Tardiff and Rosbash 2006). In contrast, the dissociation of Msl5/Mud2 has not been reported to be directly coupled to U2 binding. Temperature-sensitive mutations of Msl5, which block the formation of CC2 in vitro at nonpermissive temperatures, do not affect prespliceosome assembly (U2 association) (Rutz and Séraphin 1999, 2000). The observed lack of U1 stabilization on exon 2 in the context of reduced U2 binding in *prp45*(1–169) cells suggests that Prp45 contributes to the coupling of U1 dissociation to subsequent binding events.

U1 snRNP occupancy may decrease too early for the delayed U2/tri-snRNP to bind efficiently. Splicing can be accomplished without U1 only in genes with specific *cis* elements (Crispino et al. 1996). Overexpression of SR proteins can compensate for the depletion of U1 in HeLa cells (Crispino et al. 1994). Intriguingly, the organism that lacks the Prp45 homolog, *Cyanidioschyzon merolae*, has a reduced splicing system without U1 snRNP, NTC, and RES proteins (see also below; Stark et al. 2015). Splicing in this reduced setting probably proceeds through the formation of the U2/tri-snRNP complex without the U1 recognition event.

Truncated Prp45 lacks parts that contact U2 components

Prp45 is an essential protein and its extensive truncation, which lacks the conserved SNWKN motif as well as the C-terminal 210 amino acids of the protein, is compatible with

growth (Gahura et al. 2009). According to available spliceosome structures of *S. cerevisiae*, *S. pombe*, and *H. sapiens* (Yan et al. 2015, 2016; Bertram et al. 2017), Prp45/Snw1/SKIP interacts with a number of proteins across the spliceosome, with contacts to Prp8 occurring along the entire length of Prp45/Snw1/SKIP (Fig. 5A). The NTD domain of Prp8 is bound through the conserved DPL and SNWKN motifs of Prp45 (amino acids 120–122 and 170–174, respectively), and the RT domain is contacted by the C-terminal helix of Prp45. The structure of the *S. cerevisiae* B^{act} complex (unlike other available spliceosome structures) also contains structural data for part of the C terminus of Prp45 (amino acids 303–350). In the B^{act} spliceosome, amino acids 303–350 of Prp45 contact with the linker domain and the RH domain of Prp8 (the amino acids 303–320 and 329–350 of Prp45, respectively). Interestingly, the RH domain changes its position with respect to other domains of Prp8 during B^{act}–C^{*} transitions (Bertram et al. 2017). The contacts and position

of the C terminus of Prp45 (amino acids 329–350) stabilized by the RH domain are thus likely to be stage-specific.

With respect to other proteins, Prp45(1–169) extensively contacts Prp46 (wrapping around its globular fold) and Slt11/Ecm2. In addition, contacts also occur with Cef1, Clf1, Cwc15, and Syf2, all of which are NTC components. The portion of Prp45 that is ablated (amino acids 170–379) has closer interactions with Prp8, Syf2, and Cef1, and, in addition, contacts the SF3b scaffold Hsh155 and the RES proteins Ist3, Cwc26/Bud13, and Pml1 (see Yan et al. 2017). Truncated Prp45 ends only N-terminally at the highly conserved SNWKN motif (amino acids 170–174), thus lacking a contact which is present in both *S. cerevisiae* and *S. pombe* structures between this motif and the U-rich loop of U2 snRNA of the B^{act} complex (Yan et al. 2015, 2016). Remarkably, despite the loss of this interaction, the ablation of the SNWKN motif is compatible with splicing. The more extensive C-terminal truncation of *prp45*(1–131) is viable,

but the cells are already severely growth-impaired (K Abrahámová, unpubl.). The contacts of the Prp45 chain between amino acids 131 and 169 include Prp46, Cef1, and Clf1. N-terminal truncations (implicating the lack of Prp46-binding interface parts) are also viable, provided, however, that the C-terminal part is retained (Martínková et al. 2002; Albers et al. 2003).

Because of its intrinsically disordered character and nonglobular nature, it is likely that Prp45 acts in a complex with its partners, not as a free protein. The truncated form may exist in a complex with Prp8 and NTC, similar to the WT protein. However, based on the structural information from the B^{act} complex, the mutant should be deficient in mediating contacts or regulatory inputs to U2 snRNP and the RES complex (Fig. 5A).

After assembly, Prp45 is present in the spliceosome through the whole splicing cycle (Albers et al. 2003). Using chemical crosslinking, Prp45 has been found to be in the vicinity of intronic RNA in the C complex, where it overlaps the contacts of the RES complex subunit: Snu17, Hsh155, and Prp8 (Schneider et al. 2015). In the human C^{*} complex, the C-terminal helix of SKIP contacts with Prp22 helicase (DHX8) (Bertram et al. 2017). Accordingly, biochemical evidence implicates Prp45 in the recruitment of Prp22 (Gahura et al. 2009). SNW1/SKIP thus not only spans the whole spliceosomal core, but also

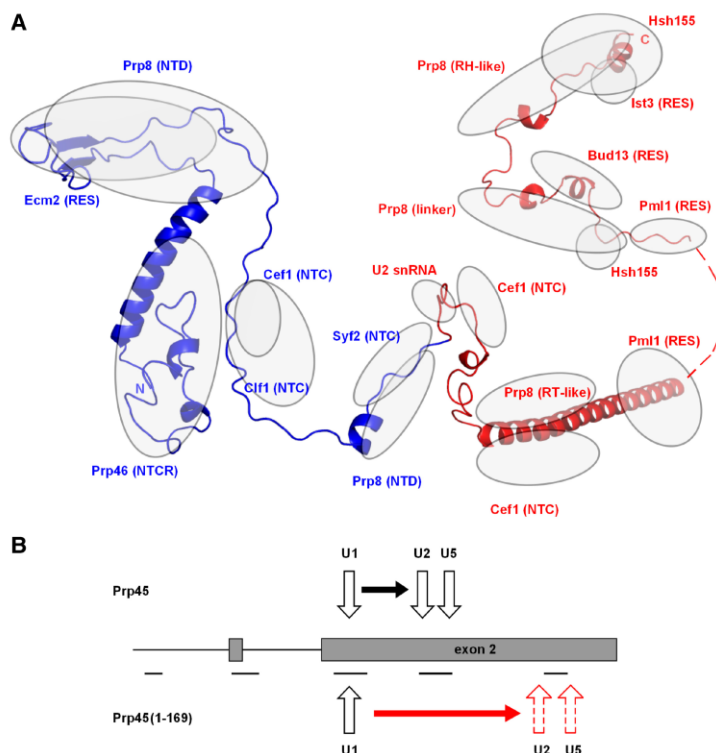


FIGURE 5. Truncation of Prp45 opens a gap between U1 dissociation and U2/U5 snRNP recruitment. (A) Scheme of Prp45 conformation and contacts within the spliceosome. The ribbon diagram combines information from the cryo-EM structure of the *S. cerevisiae* B^{act} (5GM6) and human C^{*} (5MQF) complexes (Yan et al. 2016; Bertram et al. 2017). Amino acids missing in the Prp45(1–169) mutant are labeled red (i.e., 170–379). Regions of close contact for Prp45 and proteins/RNA (i.e., encompassing <4 Å intermolecular distances) are indicated by gray ovals. (B) Scheme summarizing the effect of the *prp45*(1–169) allele on cotranscriptional splicing. The amplicons used for ChIP analysis are indicated by lines under the gene diagram.

connects it with effector enzymes positioned at the periphery—with Prp22 helicase via its C-terminal helix (Bertram et al. 2017) and PPIL1 isomerase through its N terminus (Skrůžný et al. 2001; Xu et al. 2006).

Post-transcriptional splicing is compatible with growth in *S. cerevisiae*

Data from single-molecule intron-tracking experiments document that the speeds of splicing and transcription are tuned with respect to each other, so that splicing occurs in close vicinity of the RNA Pol II holocomplex (Carillo Oesterreich et al. 2016). This physical proximity may be important for the availability of some splicing factors/regulators. Increasing the distance between the two complexes also changes the circumstances, which are important for splice site choice. For example, more alternative splice sites or regulatory *cis* sequences can compete (as they emerge from the RNA Pol II exit channel) (Carillo Oesterreich et al. 2016 and references therein). Truncation of Prp45 hinders spliceosome assembly so that splicing can no longer keep pace with transcribing RNA Pol II. Nevertheless, the defect is still compatible with viability at 30°C. While *S. cerevisiae* cells tolerate extensive truncations of Prp45, *S. pombe* cells do not [Snw1(1–280) does not complement *SNW1* deletion; data not shown]. It is possible that *S. pombe* is more dependent on the coordination of transcription and splicing, as it has less conserved splicing sequences, more alternative splice sites, and more Metazoan-like organization of its intronome (Wood et al. 2002; Kuhn and Käufer 2003; Carillo Oesterreich et al. 2016).

We conclude that the C-terminal part of Prp45 is important for both U2 and tri-snRNP association kinetics, perhaps enabling them to attain an association-competent state (Fig. 5B). These results thus add Prp45 to the list of spliceosomal components that have been shown to affect spliceosome assembly “from afar,” even though not yet incorporated into the prespliceosome-pre-mRNA complex (Price et al. 2014). This suggests that the interactions that must be considered in order to better explain splice site recognition and spliceosome assembly encompass not only the firmly bound snRNP particles but also the surrounding compartment with transiently interacting components.

MATERIALS AND METHODS

Yeast strains, plasmids, and media

Yeast strains are listed in Table 1. The strains were grown in synthetic (SD) or YPAD media. The *PRP45* truncation was generated using an integration cassette obtained by PCR with pFA6-3HA-NatMX6 (Van Driessche et al. 2005) or pFA6-3HA-kanMX6 (Longtine et al. 1998) as a template, or by replacing the *PRP45* coding sequence for amino acids 170–379 using the *delitto perfetto* method (Storici and Resnick 2006).

Plasmids R1070 (Mer1-expressing plasmid), R1130 (empty vector), SpR-AMA1-CUP1, ExR-AMA1-CUP1, ExR-AU-AMA1-CUP1, SpR-AMA1-lacZ, and ExR-AMA1-lacZ were generously gifted to us by Marc Spingola (Engbrecht et al. 1991; Scherrer and Spingola 2006). Plasmid ExR-AU-AMA1-lacZ was prepared from ExR-AU-AMA1-CUP1 by replacing the *CUP1* gene using the KpnI fragment encoding *lacZ*.

TABLE 1. Strains used in this study

| Strain | Genotype | Reference |
|--------------|--|-------------------------|
| EGY48 | <i>MATα ura3 his3 trp1 LexA(6xop)-LEU2</i> | Golemis et al. 1998 |
| KAY02 | <i>MATα ura3 his3 trp1 LexA(6xop)-LEU2, prp45(1–169)-3HA::KanMX6</i> | Gahura et al. 2009 |
| BY4741 | <i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i> | Euroscarf |
| AVY17 | <i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 prp45(1–169)-3HA::NatMX6</i> | This study |
| 46ΔCUP | <i>MATα ade2 cup1Δ::URA3 his3 leu2 lys2 trp1 ura3 GAL+</i> | Lesser and Guthrie 1993 |
| MHY04 | <i>MATα prp45(1–169)-HA::KanMX6 ade2 cup1Δ::URA3 his3 leu2 lys2 trp1 ura3 GAL+</i> | This study |
| <i>mud2Δ</i> | <i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 YKL074c::KanMX4</i> | Euroscarf |
| <i>rrp6Δ</i> | <i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 YOR001w::KanMX4</i> | Euroscarf |
| Prp42-HA | <i>MATα ura3 his3-11 leu2-3,112 trp1-1 can1-100 prp42::prp42HA/KanMX6 rpo21::rpo21MYC/HIS</i> | Kotovic et al. 2003 |
| KAY21 | <i>MATα ura3 his3-11 leu2-3,112 trp1-1 can1-100 prp42::prp42HA/KanMX6 rpo21::rpo21MYC/HIS prp45(1–169)::NatMX6</i> | This study |
| Msl5-HA | <i>MATα ura3 his3-11 leu2-3,112 trp1-1 can1-100 MSL5-HA/TRP</i> | Görnemann et al. 2005 |
| KAY22 | <i>MATα ura3 his3-11 leu2-3,112 trp1-1 can1-100 MSL5-HA/TRP prp45(1–169)::NatMX6</i> | This study |
| Mud2-HA | <i>MATα ura3 his3-11 leu2-3,112 trp1-1 can1-100 MUD2-HA/TRP</i> | Görnemann et al. 2005 |
| KAY23 | <i>MATα ura3 his3-11 leu2-3,112 trp1-1 can1-100 MUD2-HA/TRP prp45(1–169)::NatMX6</i> | This study |
| Msl1-HA | <i>MATα ura3 his3-11 leu2-3,112 trp1-1 can1-100 MSL1-HA/TRP</i> | Görnemann et al. 2005 |
| KAY24 | <i>MATα ura3 his3-11 leu2-3,112 trp1-1 can1-100 MSL1-HA/TRP prp45(1–169)::NatMX6</i> | This study |
| Brr2-HA | <i>MATα ura3 his3-11 leu2-3,112 trp1-1 can1-100 BRR2-HA/TRP DBP2-GFP/Kanr (JG12)</i> | Görnemann et al. 2005 |
| MHY15 | <i>MATα ura3 his3-11 leu2-3,112 trp1-1 can1-100 BRR2-HA/TRP DBP2-GFP/Kanr (JG12) prp45(1–169)</i> | This study |
| Prp19-HA | <i>MATα ura3 his3-11 leu2-3,112 trp1-1 can1-100 PRP19-HA DBP2-GFP (JG12)</i> | Görnemann et al. 2005 |
| MHY16 | <i>MATα ura3 his3-11 leu2-3,112 trp1-1 can1-100 PRP19-HA DBP2-GFP (JG12) prp45(1–169)</i> | This study |

Nucleic acid extraction for transcriptome analysis

Yeast cultures were grown at 30°C in a YPAD medium. Cells (8 mL) were harvested by centrifugation (1000g, 3 min, room temperature) during the exponential growth phase. Cell pellets were stored at –80°C. The pellets were thawed on ice and then 400 µL of extraction buffer (0.1 M Tris–HCl pH 7.5, 1 mM EDTA, 0.1 M LiCl, 1% SDS), 400 µL glass beads, and 400 µL of acid phenol (pH 4.3):chloroform:isoamyl alcohol (25:24:1) solution were added. Cells were disrupted using FastPrep-24 (MP Biomedicals), lysates were spun, and the total RNA was precipitated from the aqueous layer using 96% EtOH. One hundred and fifty micrograms of RNA was taken and adjusted with DEPC-treated water to 175 µL of the total volume. To remove DNA, 20 µL of the DNase buffer and 5 µL of DNase from a MasterPure Yeast RNA Purification Kit (Epicentre Biotechnologies) were added; further steps were performed according to the manufacturer's instructions. After rinsing in 70% EtOH, 500 µL of 70% EtOH was added to the RNA pellets and stored at –20°C.

Transcriptome sequencing

Poly(A)-enrichment and strand-specific RNA-seq library preparation and sequencing (Illumina, 100 nt, paired-end) were carried out by BGL, Hong Kong. The sequencing data are available from the ArrayExpress database (www.ebi.ac.uk/arrayexpress) under accession number E-MTAB-5149.

RNA-seq data analysis

The quality of sequencing reads was verified with fastQC 0.11.4 (www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/). Reads were aligned to the *S. cerevisiae* genome r64 using HISAT 2.0.3-beta (Kim et al. 2015). Nonuniquely mapping reads (MAPQ < 10) were filtered out using SAMtools 1.3.1 (Li et al. 2009). Analysis of differential gene expression was performed using R (www.r-project.org/) and the Bioconductor package DESeq2 (Love et al. 2014; Huber et al. 2015).

Splicing efficiency for each intron was calculated as described previously (Převorovský et al. 2016). Briefly, transreads (reads spanning exon–exon junctions, reflecting the abundance of spliced mRNA) were extracted using regtools 0.2.0 (<https://regtools.readthedocs.io>) and quantified for each junction. The number of reads spanning the most 5'-terminal base of each intron (reflecting unspliced pre-mRNA abundance) was determined using BEDTools 2.25.0 (Quinlan 2014). Splicing efficiency (Fig. 1B) was then calculated as the ratio of transreads (mRNA) to intron-end reads (pre-mRNA).

In the comparisons of pre-mRNA and mRNA abundance of intron-containing genes (Fig. 1A), sequencing read counts were first normalized to account for different sequencing library sizes (i.e., sample sequencing depth). To this end, a group of control intronless genes was selected, which showed unchanged expression between WT and the *prp45*(1–169) mutant according to DESeq2 analyses ($n = 178$ control genes). The median of the mutant/WT mRNA abundance ratios of these control genes was then used to normalize the respective read counts from the mutant to the WT in each biological replicate. Relative pre-mRNA and mRNA abundance for the WT and mutant were then analyzed by comparing the normalized 5' intron-end read counts and transread counts, respectively.

RT-qPCR

Total RNA was extracted using the MasterPure Yeast RNA Purification Kit (Epicentre Biotechnologies) according to the manufacturer's protocol. Complementary DNA was synthesized using the RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific), random hexamer primers, and 2 µg of RNA as a template. qPCR was performed on a LightCycler 480 II (Roche). Each reaction (total volume of 12.5 µL) consisted of 6.25 µL of MESA GREEN qPCR MasterMix Plus for SYBR Assay, no ROX (Eurogentec), 0.3 mM primers, and 0.05 µL of cDNA. Primer sequences are summarized in Table 2. Each sample was run in triplicate. Results were calculated either using the $\Delta\Delta C_t$ method (Livak and Schmittgen 2001) or using a calibration curve calculated from standards included in each run.

ONPG assay

Cells were cultivated to the middle exponential phase (corresponding to OD 0.5–0.8) in the appropriate media and the equivalent of 4 OD was harvested by centrifugation. The cell pellet was washed with Z-buffer (60 mM Na₂HPO₄, 40 mM NaH₂PO₄ [pH 7.0], 10 mM KCl, 1 mM MgSO₄) and resuspended in the Z-buffer to a final volume of 1 mL. Samples were transferred on ice and 3.4 µL of β -mercaptoethanol was added. The cell suspension (300 µL) was mixed with glass beads and lysed using FastPrep-24 (MP Biomedicals; speed 6; four cycles; cycle duration 15 sec; 5 min on ice between cycles). After lysis, 300 µL of Z-buffer was added and samples were mixed by vortexing. Samples (250 µL each) were incubated with 350 µL of Z-buffer and 80 µL of freshly made ortho-nitrophenyl- β -galactoside (ONPG) solution (4 mg/mL) in Z-buffer at 30°C for 60 min in a shaker. The reaction was then stopped by adding 250 µL of 1 M Na₂CO₃; samples were centrifuged, and supernatants collected. Absorbance was measured at 420 and 550 nm using the spectrophotometer UV Mini 1240 (Shimadzu). Miller units of activity were calculated using the formula $MU = 1000 \times [(A_{420} - 1.75 \times A_{550})] / (T \times V \times OD_{600})$, where OD₆₀₀ is the optical density of the cell suspension after centrifugation, washing and volume adjustment to 1 mL, T is the incubation time in minutes, and V is the volume of the cell suspension used for the enzymatic reaction in milliliters.

Chromatin immunoprecipitation

Cells were grown in 50 mL YPAD or SD media to OD 0.6 and fixed by shaking for 30 min in 1% formaldehyde (Sigma-Aldrich; 1% solution in medium) at room temperature. Formaldehyde was quenched with 0.125 M glycine for 10 min. Cells were harvested by centrifugation and washed with deionized water; the cell pellet was stored at –80°C. The pellet was thawed in 270 µL of LB buffer (50 mM HEPES pH 7.6, 1 mM EDTA, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0.1 mM Na-DCC, protease inhibitor cocktail [Serva]), mixed with glass beads and lysed using FastPrep-24 (MP Biomedicals; speed 5.5; three cycles; cycle duration 13 sec; 5 min on ice between cycles). The disrupted cells were collected by centrifugation; the pellet was washed with 600 µL of LB buffer and resuspended in 270 µL of the same buffer. Chromatin was fragmented to ~500 bp by sonication (Bioruptor sonicator, Diagenode; “high” settings; 15 cycles; 30 sec on followed by 30 sec off; 2°C water bath). Samples were centrifuged and the supernatant collected. Protein concentration was

TABLE 2. Primers used in this study

| Primer ID | Primer sequence |
|------------------------|-----------------------------------|
| ECM33-mRNA-F | CTCCGCTCTAGCTGCTAAC |
| ECM33-mRNA-R | ACCGGAGATTTGTCCAAATCAG |
| ECM33-pre-mRNA-F | CTGTCATAGGATTAGGGCGAG |
| ECM33-pre-mRNA-R | GAAGTAGTTGAGTTAGCTGCTTAG |
| ACT1-mRNA-F | AATTTACTGAATTAACAATGGATTCTGAGG |
| ACT1-mRNA-R | GATAGATGGGAAGACAGCACG |
| ACT1-pre-mRNA-F | AATTTACTGAATTAACAATGGATTCTGCTTA |
| ACT1-pre-mRNA-R | AGGTTATGGGAGAGTGAAAAATAGTA |
| TUB1-mRNA-F | AGAGAAGTTATTAGTATTAATGTC |
| TUB1-mRNA-R | TCTTCTAGATGTCCATCC |
| TUB1-pre-mRNA-F | AAACAATGAGAGAAGTTATTAGTATTAATGGTA |
| TUB1-pre-mRNA-R | TTGCGTTGAAGTTAGTAATGAAAGATG |
| TUB3-mRNA-F | GACAATGAGAGAGGTCATTAGTATTAATGTTG |
| TUB3-mRNA-R | CCTCCAAATGGCCGCTCTTC |
| TUB3-pre-mRNA-F | GACAATGAGAGAGGTCATTAGTATTAATGGTA |
| TUB3-pre-mRNA-R | GAATGAATCAAACAGATCAGATCAAAC |
| APS3-mRNA-F | GTTACACAATGATTCATGCAGTTCTAATATTC |
| APS3-mRNA-R | AATTCATATACCTGCTCTAATAGCAGTTTGTG |
| APS3-pre-mRNA-F | GTTACACAATGATTCATGCAGTTCTAATATGT |
| APS3-pre-mRNA-R | GGTTGGCATTCTTATTGACTATACCAA |
| RPO26-mRNA-F | CAGACTACGAGGAGGCGTTTA |
| RPO26-mRNA-R | GTTTTCTCATAAGTCTCCTCATCAG |
| RPO26-pre-mRNA-F | AGACTACGAGGAGGCGTATG |
| RPO26-pre-mRNA-R | GTCGTTAAACCTGTATCACAAATGATAGAAG |
| IMD4-mRNA-F | TCTGGCTTCCCAGTTACTGAA |
| IMD4-mRNA-R | AAGAATCATCTTCTAAGAAATGTATATCACGA |
| IMD4-pre-mRNA-F | CTTTCGTTCTACTGACTG |
| IMD4-pre-mRNA-R | CACACATAATGGGCTTTTC |
| COF1-mRNA-F | CTAACAAAAGAAGATGTCTAGATCTGGTG |
| COF1-mRNA-R | GGTTTTAGCATCGTTCAATCCG |
| COF1-pre-mRNA-F | ACAAAAGAAGATGTCTAGATCTGGGTA |
| COF1-pre-mRNA-R | GTTCCATGTTAAAAAGGAGGAAAGA |
| TOM22-F | CGACGTTGTGCATGATGAAG |
| TOM22-R | GCAACGATTCTGTCCAAC |
| MER2-mRNA-F | ATGCTGCTACGAACGGAAAC |
| MER2-mRNA-R | TTCTCGTCGCCTTTCGATAAC |
| MER2-pre-mRNA-F | GATGCTGCTACGAACGGTT |
| MER2-pre-mRNA-R | TCACGTTTCTATACTACAGTTGTTAG |
| ECM33-A-F | TTTCGGTAGCGTGCTTGAG |
| ECM33-A-R | GCAAGAGAGGTCCGTTGAT |
| ECM33-B-F | ATTCAAGAACGCTTTGACTGCT |
| ECM33-B-R | TCGAGATTGTGAGGAAAGAGG |
| ECM33-C-F | GTACTTCTGCCACTGCTACTG |
| ECM33-C-R | AAGATAGTCAAGGAACCATCAATCTC |
| ECM33-D-F | TTGGAAAGTGTCGAAGTTTCTC |
| ECM33-D-R | GTAGTGTGTCACCGTTGGAAG |
| ECM33-E-F | CGACTCTTCTTCCAGTAACCTCTC |
| ECM33-E-R | AGATGTGGCACCGTTCTTG |
| ACT1-A-F | TACATCAGCTTTTAGATTTTTCACG |
| ACT1-A-R | GCTAGAACATACCAGAATCCATTG |
| ACT1-B-F | AACGGTTCTGGTATGTGTAAAGC |
| ACT1-B-R | ACCGACGATAGATGGGAAGAC |
| ACT1-C-F | GATGGTGTTACTACGTCGTTTC |
| ACT1-C-R | GTAGTCAGTCAAACTCTACCGGC |
| ACT1-D-F | GAAGGTCAAGATCATTGCTCCTC |
| ACT1-D-R | GAAACACTTGTGGTGAAACGATAG |
| TEL VIR-F ^a | AAATGGCAAGGGTAAAAACAG |
| TEL VIR-R ^a | TCGGATCACTACACCGGAAAT |

^aWyce et al. 2007.

measured by UV absorption at 280 nm using a Nanodrop 2000 (Thermo Scientific) and adjusted to the same level with the LB buffer. Samples were cleared for 1 h with 20 µL of protein A sepharose (GE Healthcare; blocked with 0.5 mg/mL BSA). An aliquot of the sonicated sample was saved as an input; 240 µL was mixed with 10 µL of an anti-HA (HA.11, Covance) or anti-Rbp3 (1Y26 [1Y27], Santa Cruz Biotechnology) antibody. A 1-h preincubation was followed by a 3-h incubation with 40 µL of protein A sepharose. All sepharose incubations were carried out on a rotator in a cold room. Sepharose beads were washed six times with IP buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 1% Triton X-100, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.5% NP-40). For decrosslinking and DNA isolation, 100 µL of 10% Chelex (Bio-Rad) was added to the beads, mixed by vortexing, and incubated for 10 min at 95°C. Samples were then cooled down and incubated with 1 µL of proteinase K (20 mg/mL) for 30 min at 55°C on a shaker. Proteinase K was inactivated by incubating for 10 min at 95°C. Samples were centrifuged and the DNA containing the supernatant was collected. The slurry was washed once again with 60 µL of deionized water, centrifuged, and the supernatants pooled. Input DNA was isolated using the same protocol. qPCR analysis was performed as described above with 20 ng of DNA as a template. Primer sequences are summarized in Table 2.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank K. Neugebauer for the strains with HA-tagged splicing factors and M. Spingola's laboratory for the *AMAI*-based reporters. This work was supported by Charles University grants GAUK (Grantová Agentura Univerzity Karlovy) 441711, UNCE (Univerzita Karlova) 204013, SVV244-260435, and PRIMUS/MED/26, and by the European Social Fund Project no. CZ.1.07/2.3.00/30.0022.

Received May 5, 2017; accepted June 21, 2017.

REFERENCES

- Abovich N, Liao XC, Rosbash M. 1994. The yeast MUD2 protein: an interaction with PRP11 defines a bridge between commitment complexes and U2 snRNP addition. *Genes Dev* 8: 843–854.
- Ajuh P, Kuster B, Panov K, Zomerdijs JCBM, Mann M, Lamond AI. 2000. Functional analysis of the human CDC5L complex and identification of its components by mass spectrometry. *EMBO J* 19: 6569–6581.

- Albers M, Diment ANN, Muraru M, Russell CS, Beggs JD. 2003. Identification and characterization of Prp45p and Prp46p, essential pre-mRNA splicing factors. *RNA* **9**: 138–150.
- Alexander R, Beggs JD. 2010. Cross-talk in transcription, splicing and chromatin: who makes the first call? *Biochem Soc Trans* **38**: 1251–1256.
- Ambrozová M, Půta F, Fuková I, Skrzuný M, Brábek J, Folk P. 2001. The fission yeast ortholog of the coregulator SKIP interacts with the small subunit of U2AF. *Biochem Biophys Res Commun* **284**: 1148–1154.
- Ast G, Weiner AM. 1997. A novel U1/U5 interaction indicates proximity between U1 and U5 snRNAs during an early step of mRNA splicing. *RNA* **3**: 371–381.
- Balzer RJ, Henry MF. 2008. Snu56p is required for Mer1p-activated meiotic splicing. *Mol Cell Biol* **28**: 2497–2508.
- Bentley DL. 2014. Coupling mRNA processing with transcription in time and space. *Nat Rev Genet* **15**: 163–175.
- Berglund JA, Chua K, Abovich N, Reed R, Rosbash M. 1997. The splicing factor BBP interacts specifically with the pre-mRNA branchpoint sequence UACUAAAC. *Cell* **89**: 781–787.
- Bertram K, Agafonov DE, Liu W-T, Dybkov O, Will CL, Hartmuth K, Urlaub H, Kastner B, Stark H, Lührmann R. 2017. Cryo-EM structure of a human spliceosome activated for step 2 of splicing. *Nature* **542**: 318–323.
- Bessonov S, Anokhina M, Will CL, Urlaub H, Lührmann R. 2008. Isolation of an active step I spliceosome and composition of its RNP core. *Nature* **452**: 846–850.
- Boesler C, Rigo N, Anokhina M, Tauchert MJ, Agafonov DE, Kastner B, Urlaub H, Ficner R, Will CL, Lührmann R. 2016. A spliceosome intermediate with loosely associated tri-snRNP accumulates in the absence of Prp28 ATPase activity. *Nat Commun* **7**: 11997.
- Brès V, Gomes N, Pickle L, Jones KA. 2005. A human splicing factor, SKIP, associates with P-TEFb and enhances transcription elongation by HIV-1 Tat. *Genes Dev* **19**: 1211–1226.
- Brès V, Yoshida T, Pickle L, Jones KA. 2009. SKIP interacts with c-Myc and Menin to promote HIV-1 Tat transactivation. *Mol Cell* **36**: 75–87.
- Carillo Oesterreich FC, Herzl L, Straube K, Hujer K, Howard J, Neugebauer KM. 2016. Splicing of nascent RNA coincides with intron exit from RNA polymerase II. *Cell* **165**: 372–381.
- Chan SP, Cheng SC. 2005. The Prp19-associated complex is required for specifying interactions of U5 and U6 with pre-mRNA during spliceosome activation. *J Biol Chem* **280**: 31190–31199.
- Chan SP, Kao DI, Tsai WY, Cheng SC. 2003. The Prp19p-associated complex in spliceosome activation. *Science* **302**: 279–282.
- Chanarat S, Sträßer K. 2013. Splicing and beyond: the many faces of the Prp19 complex. *Biochim Biophys Acta* **1833**: 2126–2134.
- Chen Y, Zhang L, Jones KA. 2011. SKIP counteracts p53-mediated apoptosis via selective regulation of p21^{Cip1} mRNA splicing. *Genes Dev* **25**: 701–716.
- Chung S, Mclean MR, Rymond BC. 1999. Yeast ortholog of the *Drosophila* crooked neck protein promotes spliceosome assembly through stable U4/U6.U5 snRNP addition. *RNA* **5**: 1042–1054.
- Chung S, Zhou Z, Huddleston KA, Harrison DA, Reed R, Coleman TA, Rymond BC. 2002. Crooked neck is a component of the human spliceosome and implicated in the splicing process. *Biochim Biophys Acta* **1576**: 287–297.
- Colot HV, Stutz F, Rosbash M. 1996. The yeast splicing factor Mud13p is a commitment complex component and corresponds to CBP20, the small subunit of the nuclear cap-binding complex. *Genes Dev* **10**: 1699–1708.
- Crispino JD, Blencowe BJ, Sharp PA. 1994. Complementation by SR proteins of pre-mRNA splicing reactions depleted of U1 snRNP. *Science* **265**: 1866–1869.
- Crispino JD, Mermoud JE, Lamond AI, Sharp PA. 1996. Cis-acting elements distinct from the 5' splice site promote U1-independent pre-mRNA splicing. *RNA* **2**: 664–673.
- Dahl R, Wani B, Hayman MJ. 1998. The Ski oncoprotein interacts with Skip, the human homolog of *Drosophila* Bx42. *Oncogene* **16**: 1579–1586.
- Das RK, Huang Y, Phillips AH, Kriwacki RW, Pappu RV. 2016. Cryptic sequence features within the disordered protein p27^{Kip1} regulate cell cycle signaling. *Proc Natl Acad Sci* **113**: 5616–5621.
- Engbrecht J, Voelkel-Meiman K, Roeder GS. 1991. Meiosis-specific RNA splicing in yeast. *Cell* **66**: 1257–1268.
- Fabrizio P, Dannenberg J, Dube P, Kastner B, Stark H, Urlaub H, Lührmann R. 2009. The evolutionarily conserved core design of the catalytic activation step of the yeast spliceosome. *Mol Cell* **36**: 593–608.
- Fica SM, Oubridge C, Galej WP, Wilkinson ME, Bai X-C, Newman AJ, Nagai K. 2017. Structure of a spliceosome remodelled for exon ligation. *Nature* **542**: 377–380.
- Folk P, Půta F, Skrzuný M. 2004. Transcriptional coregulator SNW/SKIP: the concealed tie of dissimilar pathways. *Cell Mol Life Sci* **61**: 629–640.
- Gahura O, Abrahámová K, Skrzuný M, Valentová A, Munzarová V, Folk P, Půta F. 2009. Prp45 affects Prp22 partition in spliceosomal complexes and splicing efficiency of non-consensus substrates. *J Cell Biochem* **106**: 139–151.
- Galej WP, Wilkinson ME, Fica SM, Oubridge C, Newman AJ, Nagai K. 2016. Cryo-EM structure of the spliceosome immediately after branching. *Nature* **537**: 197–201.
- Golemis EA, Serebriiskii I, Finley RL, Kolonin MG, Gyuris J, Brent R. 1998. Interaction trap/two-hybrid system to identify interacting proteins. *Curr Protoc Prot Sci* **82**: 20.1.1–20.1.35.
- Görnemann J, Kotovic KM, Hujer K, Neugebauer KM. 2005. Cotranscriptional spliceosome assembly occurs in a stepwise fashion and requires the cap binding complex. *Mol Cell* **19**: 53–63.
- Hang J, Wan R, Yan C. 2015. Structural basis of pre-mRNA splicing. *Science* **349**: 1191–1198.
- Hartmuth K, Urlaub H, Vornlocher HP, Will CL, Gentzel M, Wilm M, Lührmann R. 2002. Protein composition of human prespliceosomes isolated by a tobramycin affinity-selection method. *Proc Natl Acad Sci* **99**: 16719–16724.
- Hoskins AA, Friedman LJ, Gallagher SS, Crawford DJ, Anderson EG, Wombacher R, Ramirez N, Cornish VW, Gelles J, Moore MJ. 2011. Ordered and dynamic assembly of single spliceosomes. *Science* **331**: 1289–1295.
- Huber W, Carey VJ, Gentleman R, Anders S, Carlson M, Carvalho BS, Bravo HC, Davis S, Gatto L, Girke T, et al. 2015. Orchestrating high-throughput genomic analysis with Bioconductor. *Nat Methods* **12**: 115–121.
- Jurica MS, Moore MJ. 2003. Pre-mRNA splicing: awash in a sea of proteins. *Mol Cell* **12**: 5–14.
- Jurica MS, Licklider LJ, Gygi SR, Grigorieff N, Moore MJ. 2002. Purification and characterization of native spliceosomes suitable for three-dimensional structural analysis. *RNA* **8**: 426–439.
- Kawashima T, Douglass S, Gabunilas J, Pellegrini M, Chanfreau GF. 2014. Widespread use of non-productive alternative splice sites in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS Genet* **10**: e1004249.
- Kim D, Langmead B, Salzberg SL. 2015. HISAT: a fast spliced aligner with low memory requirements. *Nat Methods* **12**: 357–360.
- Konarska MM, Vilardeil J, Query CC. 2006. Repositioning of the reaction intermediate within the catalytic center of the spliceosome. *Mol Cell* **21**: 543–553.
- Korneta I, Bujnicki JM. 2012. Intrinsic disorder in the human spliceosomal proteome. *PLoS Comput Biol* **8**: e1002641.
- Kotovic KM, Lockshon D, Boric L, Neugebauer KM. 2003. Cotranscriptional recruitment of the U1 snRNP to intron-containing genes in yeast. *Mol Cell Biol* **23**: 5768–5779.
- Kuhn AN, Käufer NF. 2003. Pre-mRNA splicing in *Schizosaccharomyces pombe*: regulatory role of a kinase conserved from fission yeast to mammals. *Curr Genet* **42**: 241–251.
- Lacadie SA, Rosbash M. 2005. Cotranscriptional spliceosome assembly dynamics and the role of U1 snRNA:5' ss base pairing in yeast. *Mol Cell* **19**: 65–75.

- Lesser CF, Guthrie C. 1993. Mutational analysis of pre-mRNA splicing in *Saccharomyces cerevisiae* using a sensitive new reporter gene, CUP1. *Genetics* **133**: 851–863.
- Li H, Handsaker B, Wysoker A, Fennell T, Ruan J, Homer N, Marth G, Abecasis G, Durbin R; 1000 Genome Project Data Processing Subgroup. 2009. The sequence alignment/map format and SAMtools. *Bioinformatics* **25**: 2078–2079.
- Li X, Zhang W, Xu T, Ramsey J, Zhang L, Hill R, Hansen KC, Hesselberth JR, Zhao R. 2013. Comprehensive in vivo RNA-binding site analyses reveal a role of Prp8 in spliceosomal assembly. *Nucleic Acids Res* **41**: 3805–3818.
- Livak KJ, Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method. *Methods* **25**: 402–408.
- Longtine SM, McKenzie A III, Demarini DJ, Shah NG, Wach A, Brachet A, Philippsen P, Pringle RJ. 1998. Additional modules for versatile and economical PCR-based gene deletion and modification in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **14**: 953–961.
- Love MI, Huber W, Anders S. 2014. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol* **15**: 550.
- Makarova EM, Makarova OV, Urlaub H, Gentzel M, Will CL, Wilm M, Lührmann R. 2002. Small nuclear ribonucleoprotein remodeling during catalytic activation of the spliceosome. *Science* **298**: 2205–2208.
- Maroney PA, Romfo CM, Nilsen TW. 2000. Functional recognition of the 5' splice site by U4/U6.U5 tri-snRNP defines a novel ATP-dependent step in early spliceosome assembly. *Mol Cell* **6**: 317–328.
- Martínková K, Lebduška P, Skružný M, Folk P, Půta F. 2002. Functional mapping of *Saccharomyces cerevisiae* Prp45 identifies the SNW domain as essential for viability. *J Biochem* **132**: 557–563.
- Newman AJ, Teigelkamp S, Beggs JD. 1995. snRNA interactions at 5' and 3' splice sites monitored by photoactivated crosslinking in yeast spliceosomes. *RNA* **1**: 968–980.
- Ohi MD, Link AJ, Ren L, Jennings JL, McDonald WH, Gould KL. 2002. Proteomics analysis reveals stable multiprotein complexes in both fission and budding yeasts containing Myb-related Cdc5p/Cef1p, novel pre-mRNA splicing factors, and snRNAs. *Mol Cell Biol* **22**: 2011–2024.
- Převorovský M, Hálová M, Abrahámová K, Libus J, Folk P. 2016. Workflow for genome-wide determination of pre-mRNA splicing efficiency from yeast RNA-seq data. *Biomed Res Int* **2016**: 4783841.
- Price AM, Görmann J, Guthrie C, Brow DA. 2014. An unanticipated early function of DEAD-box ATPase Prp28 during commitment to splicing is modulated by U5 snRNP protein Prp8. *RNA* **20**: 46–60.
- Quinlan AR. 2014. BEDTools: The Swiss-Army tool for genome feature analysis. *Curr Protoc Bioinformatics* **47**: 11.12.1–11.12.34.
- Rain J, Legrain P. 1997. In vivo commitment to splicing in yeast involves the nucleotide upstream from the branch site conserved sequence and the Mud2 protein. *EMBO J* **16**: 1759–1771.
- Rauhut R, Fabrizio P, Dybkov O, Hartmuth K, Pena V, Chari A, Kumar V, Lee C, Urlaub H, Kastner B. 2016. Molecular architecture of the *Saccharomyces cerevisiae* activated spliceosome. *Science* **353**: 1399–1405.
- Ruby SW, Abelson J. 1988. An early hierarchic role of P1 small nuclear ribonucleoprotein in spliceosome assembly. *Science* **242**: 1028–1035.
- Rutz B, Séraphin B. 1999. Transient interaction of BBP/ScSF1 and Mud2 with the splicing machinery affects the kinetics of spliceosome assembly. *RNA* **5**: 819–831.
- Rutz B, Séraphin B. 2000. A dual role for BBP/ScSF1 in nuclear pre-mRNA retention and splicing. *EMBO J* **19**: 1873–1886.
- Scherrer FW, Spingola M. 2006. A subset of Mer1p-dependent introns requires Bud13p for splicing activation and nuclear retention. *RNA* **12**: 1361–1372.
- Schneider C, Agafonov DE, Schmitzová J, Hartmuth K, Fabrizio P, Lührmann R. 2015. Dynamic contacts of U2, RES, Cwc25, Prp8 and Prp45 proteins with the pre-mRNA branch-site and 3' splice site during catalytic activation and step 1 catalysis in yeast spliceosomes. *PLoS Genet* **11**: e1005539.
- Schreiber K, Csaba G, Haslbeck M, Zimmer R. 2015. Alternative splicing in next generation sequencing data of *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS One* **10**: e0140487.
- Skružný M, Ambrozová M, Fuková I, Martínková K, Blahůšková A, Hamplová L, Půta F, Folk P. 2001. Cyclophilins of a novel subfamily interact with SNW/SKIP coregulator in *Dictyostelium discoideum* and *Schizosaccharomyces pombe*. *Biochim Biophys Acta* **1521**: 146–151.
- Spingola M, Ares M. 2000. A yeast intronic splicing enhancer and Nam8p are required for Mer1p-activated splicing. *Mol Cell* **6**: 329–338.
- Spingola M, Armisen J, Ares M. 2004. Mer1p is a modular splicing factor whose function depends on the conserved U2 snRNP protein Snu17p. *Nucleic Acids Res* **32**: 1242–1250.
- Stark MR, Dunn EA, Dunn WSC, Grisdale CJ, Daniele AR, Halstead MRG, Fast NM, Rader SD. 2015. Dramatically reduced spliceosome in *Cyanidioschyzon merolae*. *Proc Natl Acad Sci* **112**: E1191–E1200.
- Storici F, Resnick MA. 2006. The *delitto perfetto* approach to in vivo site-directed mutagenesis and chromosome rearrangements with synthetic oligonucleotides in yeast. *Methods Enzymol* **409**: 329–345.
- Tardiff DF, Rosbash M. 2006. Arrested yeast splicing complexes indicate stepwise snRNP recruitment during in vivo spliceosome assembly. *RNA* **12**: 968–979.
- Valadkhan S, Jaladat Y. 2010. The spliceosomal proteome: at the heart of the largest cellular ribonucleoprotein machine. *Proteomics* **10**: 4128–4141.
- Van Driessche B, Tafforeau L, Hentges P, Carr AM, Vandenhoute J. 2005. Additional vectors for PCR-based gene tagging in *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe* using nourseothricin resistance. *Yeast* **22**: 1061–1068.
- Volanakis A, Passoni M, Hector RD, Shah S, Kilchert C, Granneman S, Vasiljeva L. 2013. Spliceosome-mediated decay (SMD) regulates expression of nonintronic genes in budding yeast. *Genes Dev* **27**: 2025–2038.
- Wan R, Yan C, Bai R, Huang G, Shi Y. 2016. Structure of a yeast catalytic step I spliceosome at 3.4 Å resolution. *Science* **353**: 895–904.
- Wang Z, Burge CB. 2008. Splicing regulation: from a parts list of regulatory elements to an integrated splicing code. *RNA* **14**: 802–813.
- Wang Q, Hobbs K, Lynn B, Rymond BC. 2003. The Clf1p splicing factor promotes spliceosome assembly through N-terminal tetratricopeptide repeat contacts. *J Biol Chem* **278**: 7875–7883.
- Will CL, Lührmann R. 2011. Spliceosome structure and function. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **3**: a003707.
- Wood V, Gwilliam R, Rajandream MA, Lyne M, Lyne R, Stewart A, Sgouros J, Peat N, Hayles J, Baker S, et al. 2002. The genome sequence of *Schizosaccharomyces pombe*. *Nature* **415**: 871–880.
- Wyatt JR, Sontheimer EJ, Steitz JA. 1992. Site-specific cross-linking of mammalian U5 snRNP to the 5' splice site before the first step of pre-mRNA splicing. *Genes Dev* **6**: 2542–2553.
- Wyce A, Xiao T, Whelan KA, Kosman C, Walter W, Eick D, Hughes TR, Krogan NJ, Strahl BD, Berger SL. 2007. H2B ubiquitylation acts as a barrier to Ctk1 nucleosomal recruitment prior to removal by Ubp8 within a SAGA-related complex. *Mol Cell* **27**: 275–288.
- Xu C, Zhang J, Huang X, Sun J, Xu Y, Tang Y, Wu J, Shi Y, Huang Q, Zhang Q. 2006. Solution structure of human peptidyl prolyl isomerase-like protein 1 and insights into its interaction with SKIP. *J Biol Chem* **281**: 15900–15908.
- Yan C, Hang J, Wan R, Huang M, Wong CCL, Shi Y. 2015. Structure of a yeast spliceosome at 3.6-angstrom resolution. *Science* **349**: 1182–1191.
- Yan C, Wan R, Huang G, Shi Y. 2016. Structure of a yeast activated spliceosome at 3.5 Å resolution. *Science* **353**: 904–911.
- Yan C, Wan R, Bai R, Huang G, Shi Y. 2017. Structure of a yeast step II catalytically activated spliceosome. *Science* **355**: 149–155.

RESEARCH ARTICLE

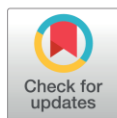
Introns provide a platform for intergenic regulatory feedback of *RPL22* paralogs in yeast

Kateřina Abrahámová[✉], Filip Nemčko[✉], Jiří Libus[✉], Martin Převorovský, Martina Hálová, František Půta, Petr Folk^{*}

Department of Cell Biology, Faculty of Science, Charles University, Prague, Czech Republic

[✉] These authors contributed equally to this work.

^{*} petr.folk@natur.cuni.cz



Abstract

Ribosomal protein genes (RPGs) in *Saccharomyces cerevisiae* are a remarkable regulatory group that may serve as a model for understanding genetic redundancy in evolutionary adaptations. Most RPGs exist as pairs of highly conserved functional paralogs with divergent untranslated regions and introns. We examined the roles of introns in strains with various combinations of intron and gene deletions in *RPL22*, *RPL2*, *RPL16*, *RPL37*, *RPL17*, *RPS0*, and *RPS18* paralog pairs. We found that introns inhibited the expression of their genes in the *RPL22* pair, with the *RPL22B* intron conferring a much stronger effect. While the WT *RPL22A/RPL22B* mRNA ratio was 93/7, the *rpl22aΔi/RPL22B* and *RPL22A/rpl22bΔi* ratios were >99/<1 and 60/40, respectively. The intron in *RPL2A* stimulated the expression of its own gene, but the removal of the other introns had little effect on expression of the corresponding gene pair. Rpl22 protein abundances corresponded to changes in mRNAs.

Using splicing reporters containing endogenous intron sequences, we demonstrated that these effects were due to the inhibition of splicing by Rpl22 proteins but not by their RNA-binding mutant versions. Indeed, only WT Rpl22A/Rpl22B proteins (but not the mutants) interacted in a yeast three-hybrid system with an *RPL22B* intronic region between bp 165 and 236. Transcriptome analysis showed that both the total level of Rpl22 and the A/B ratio were important for maintaining the WT phenotype. The data presented here support the contention that the Rpl22B protein has a paralog-specific role.

The *RPL22* singleton of *Kluyveromyces lactis*, which did not undergo whole genome duplication, also responded to Rpl22-mediated inhibition in *K. lactis* cells. Vice versa, the overproduction of the *K. lactis* protein reduced the expression of *RPL22A/B* in *S. cerevisiae*. The extraribosomal function of the *K. lactis* Rpl22 suggests that the loop regulating *RPL22* paralogs of *S. cerevisiae* evolved from autoregulation.

OPEN ACCESS

Citation: Abrahámová K, Nemčko F, Libus J, Převorovský M, Hálová M, Půta F, et al. (2018) Introns provide a platform for intergenic regulatory feedback of *RPL22* paralogs in yeast. PLoS ONE 13(1): e0190685. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0190685>

Editor: Alexander F. Palazzo, University of Toronto, CANADA

Received: August 19, 2017

Accepted: December 19, 2017

Published: January 5, 2018

Copyright: © 2018 Abrahámová et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: This work was supported by grants from the Czech Science Foundation (<https://gacr.cz/>; 14-19002S to PF) and Charles University (<http://www.cuni.cz/UK-33.html>; UNCE 204013, SVV 260310). MP and KA were partly supported by the Charles University Primus program (PRIMUS/MED/26) and by EU Social Fund Project no. CZ.1.07/2.3.00/30.0022, respectively.

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Introduction

Ribosome biogenesis absorbs a substantial portion of yeast cell resources [1]. It requires 78 ribosomal proteins (RPs), approx. 200 ribosomal protein assembly factors, and ~75 small nucleolar RNA genes [2]. All of this production needs to be precisely balanced and, perhaps more importantly for regulatory requirements, must be capable of coping with the rapid changes in ribosome numbers. Cells must be able to react to the availability of nutrients and to various stressors by speeding up or stopping growth [3]. In a fast growing cell, ribosomes must be assembled at a rate of 2000 per minute to a degree of high precision and efficiency [1,4], while leaving no unused components or stalled assembly intermediates that would otherwise hamper fitness or even endanger the cell [5,6].

Ribosomal proteins in *S. cerevisiae* are encoded by 137 genes, among which are 59 pairs of functional paralogs [7]. These paralogs originated during the events leading to whole genome duplication (WGD) in the ancestor of *Saccharomyces* before 100 My and have been retained to a considerable degree, representing ~11% of the surviving paralog pairs [8–10]. It is believed that pairs of ohnologs (paralogs that originated during WGD) brought about a higher level of regulatory complexity, increasing the spectrum of responses to varying nutrient conditions [11,12]. A control system originally regulating the expression of one ancestral gene can become intergenic [13]. *S. cerevisiae* is an intron-poor species that has lost most of its introns (only ~280 remain) [14,15]. Of these, 104 are RPG introns; therefore, given the high expression levels of RPGs [16,17], 90% of mRNA splicing is devoted to producing RPG mRNAs [1].

Although RPG paralogs mostly code for proteins of an identical or highly similar amino acid composition (35 pairs differ by less than 2 amino acids [18]), they differ markedly in their 5'- and 3'-UTR sequences and introns [19]. These differences are species/strain-specific and, at least in yeast, have been shown as subject to selection pressure [20]. Apparently, they were fixed in populations as a result of adapting to specific growth conditions and genetic backgrounds [20,21]. Some RPG pairs differ in their ORFs and their products have distinct localization patterns. These factors can affect specific aspects of cell physiology. For example, it has been reported that translation of *ASH1* mRNA requires a specific subset of ribosomal protein paralogs, including Rpl22A [22]. Shifts in the relative concentrations of paralogs can lead to subpopulations of functionally different ribosomes [23]. "Specialized" ribosomes can operate in distinct subpools of mRNA substrates or in specific compartments [22,24–26]. Recently, quantitative mass spectrometry of translationally active ribosomes from mouse embryonic stem cells confirmed ribosomal heterogeneity with respect to several RPs as well as their association with specific subsets of mRNAs [27].

RPG expression in *S. cerevisiae* is tightly coordinated with rRNA synthesis [28,29] and predominantly regulated at the levels of transcription [3,30] and splicing [31]. Systematic deletions of introns from RP genes indicate that introns affect cell fitness, rRNA processing, and the production of other paralogs in the case of duplicated RPGs [23]. Intron-containing RPGs have been shown to respond to various types of environmental stresses [21,23,31]. The mechanisms implicated in splicing-mediated regulation include the interaction of the ribosomal protein with its own (or paralogous) transcript through motifs related to rRNA structures bound by RP [32]. The ability of intramolecular pre-mRNA structures to influence splicing reactions was first established more than 30 years ago [33,34], but detailed understanding of the structural properties of introns has only recently begun to emerge [35]. Complementary sequences can base-pair over shorter or longer distances, looping out exons [36], occluding or weakening splice sites [37], or bringing splice sites into proximity [35,38,39]. In more complex scenarios, splicing signals are only modulated by the structural context, which can impact/block spliceosome assembly at later stages. One of the most extensively studied examples of intron-

mediated regulation is *RPL30*. The Rpl30 protein inhibits its own synthesis by blocking both the splicing and translation of the *RPL30* transcript [40–42]. Rpl30 binds an internal loop in the vicinity of 5' splice sites and affects U2-mediated recognition of branch points, perhaps through its effects on the U1 snRNP conformation or the structure of the transcript [43]. Other examples of splicing regulation include Rps14, which binds to *RPS14B* (but not *RPS14A*) pre-mRNA and represses its splicing [44], as well as Rps9 and Rpl22, which inhibit the splicing of *RPS9A* and *RPL22B* pre-mRNA, respectively [13,45]. These inter-paralog relationships seem to have evolved independently and in some cases several times in different taxa [13].

A high proportion of RPG pairs is unique to post-WGD yeast. However, in the cases of some RPGs, paralogs have occurred throughout evolution. The Rpl22 pair is one of the better-characterized examples of such a tendency. The available evidence documents its existence in yeast, zebrafish, *Drosophila*, mice, and humans [23,46–48]. Rpl22 and Rpl22-Like1 play extraribosomal roles in modulating the splicing of Smad2 pre-mRNA during zebrafish morphogenesis. They both bind Smad2 pre-mRNA but act antagonistically; their balance is important for correct splicing of exon 9 [49]. Rpl22 is required for T-cell differentiation in mice and for the emergence of hematopoietic stem cells in zebrafish [46]. Mouse Rpl22 binds to Rpl22l1 mRNA and regulates its expression [48]. During Epstein-Barr virus infection, human Rpl22 is sequestered by EBV-1 viral RNA, a condition which enhances the replicative potential of Burkitt lymphoma cells [50]. Human *RPL22* has also been suggested as playing a role in binding to telomerase RNA [51]. Several RPs, including Rpl22, have been implicated in p53 activation upon stress disturbing ribosome biogenesis [52,53]. Rpl22 has been recently shown to directly bind and block MDM2 [53], which is intriguing, given the occurrence of inactivating mutations of *RPL22* in various cancers [53,54]. In yeast, *RPL22A* deletion increases replicative lifespan [18] and affects sensitivity to oxidative stress [55,56] and acetic acid [57]. Furthermore, Rpl22 has been implicated in translation regulation of meiotic inducer *IME1*. The atypical 5'-UTR of the *IME1* transcript stalls its translation in *rpl22Δ* cells [58]. Recently, Gabunilas and Chanfreau reported that *RPL22* paralogs are regulated in an intergenic fashion through their introns. This regulation was mediated by Rpl22 proteins and required a structured element that did not show direct sequence homology with the rRNA binding motif to which Rpl22 binds within the ribosome [59].

In our study, we set out to analyze the roles of introns in intergenic relationships observed previously in *S. cerevisiae* [23]. Of the 7 paralog pairs examined, we found 1 intragenic and 1 intergenic intron-dependent effect in *RPL2A* and *RPL22A/B*, respectively. In this paper, we summarize our findings on the *RPL22* pair and independently demonstrate—using proteomic analysis of Rpl22 levels, three hybrid system testing, and assays with RNA-binding mutants—that intergenic regulation is mediated by Rpl22 protein-binding and is asymmetric with respect to introns. A and B introns are capable of inhibiting mRNA production of their own genes in an Rpl22-dependent way to 50% and 8% of WT levels, respectively. Importantly, we show that *Kluyveromyces lactis* *RPL22*, which is not a duplicated gene, is also subject to intron- and Rpl22 protein-mediated inhibition in *K. lactis* cells. Because Rpl22 can potentially bind to other non-ribosomal targets as well as its own pre-mRNA [49], we mapped the effects of *RPL22A/RPL22B* gene and intron deletions on the transcriptome level. Our data suggest that Rpl22B assumes a specific role which cannot be complemented by Rpl22A.

Methods

Strains, growth conditions, transformation

The strains used in this study were derived from BY4741 and BY4742 standard laboratory strains (the list is provided in [S1 Table](#)). For gene expression analysis, yeast were grown for at

least eight generations in a rich medium (YPD supplemented with adenine, YPAD) after transferring from a pre-culture until they reached the mid-exponential phase. For overexpression and primer extension analysis, cells were grown in a synthetic medium without uracil and/or histidine for two generations. Yeast transformation was performed as described [60].

Intron deletions

The *delitto perfetto* method was used to delete introns from *RPL22* genes in the BY4741 and BY4742 strains [61]. In the first step, we amplified the *URA3* gene from the pRS316 plasmid with primer pairs KA70 + KA71 and KA78 + KA79 and inserted it into the *RPL22A* and *RPL22B* intron, respectively. In the second step, cells were transformed with integrative recombinant oligonucleotides (IROs), KA72 + KA73 for *RPL22A* and KA80 + KA81 for *RPL22B*, whose integration led to the loss of the *URA3* gene together with the intron sequence. These cells were selected using 5-fluoroorotic acid (5-FOA). To delete the hairpin from the *RPL22A* intron, we used IROs KA74 + KA75. *KIRPL22* intron was removed from JLQ36 strain using the procedure described below (simplified). *URA3* cassette was amplified with primers JL479 and JL480 from pJet1-*RPL22A-RPL22Bi-URA3*. *URA3*⁺ transformants were left overnight on YPAD plates before selection on 5-FOA. Successful intron/hairpin deletions were confirmed by PCR and sequencing. The list of all oligonucleotides and plasmids used in this study is provided in S2 and S3 Tables, respectively.

Intron and gene replacement

Intron and gene swaps were performed using an approach similar to the method used by Langle-Rouault [62]. Briefly, we prepared DNA cassettes containing the sequence to be inserted, flanked by 45–50 bp arms complementary to the immediate surroundings of the destination site. The 3' flanking sequence was included twice as a direct repeat separated by the *URA3* selection marker. While *URA3* was used to select transformed cells, it was also prone to pop out via homologous recombination between the two copies of the 3' flanking sequence. These cells were then selected on a medium containing 5-FOA. The genetic manipulation was confirmed by sequencing. S4 Table summarizes the oligonucleotides used and the mode of creation for particular constructs. Two of the replacement cassettes were constructed in the pJet1 plasmid. PCR fragments produced with primers F1 + R1 (5' part containing the sequence to be inserted + flanking nucleotides) and F2 + R2 (3' part—the *URA3* marker and the second copy of the 3' flanking sequence) were first inserted individually into the pJet1 plasmid using the CloneJet kit (Thermo Fisher Scientific). The respective F1-R1 fragments were then excised by digestion with BamHI and BglII and ligated into the corresponding F2-R2-bearing constructs digested with BglII. The other cassettes were assembled by PCR with primers F1 and R2 using an overlap of 24 bp between the parts.

Plasmid construction

To generate the *RPL22* overexpression constructs, the respective *RPL22* ORFs were PCR-amplified from genomic DNA from intronless strains (KAY61 strain and primers FN12 + FN13 for *RPL22A*; KAY67 strain and primers FN14 + FN15 for *RPL22B*), digested with NcoI/BamHI, and cloned into plasmid pVTU260 digested with the same enzymes. *KIRPL22* was amplified from *Kluyveromyces lactis* IFO1267 cDNA using primers FN34 and FN35 and cloned in the same manner. For experiments using *K. lactis*, expression cassettes containing *RPL22A*, *RPL22B*, their mutated versions, and *KIRPL22* were released from pVTU260 by PaeI digestion and inserted into the pCXs22 plasmid [63].

Mutations in the Rpl22 RNA binding site [64] were designed to change lysines in the protein sequence 73-GKYLKYLTKKYLKKNQL-89 to glutamates (73-GEYLEYLTEEYLEENQL-89) by changing the lysine codons to GAA. DNA sequences coding for the Rpl22 RNA-binding mutants flanked with NcoI and BamHI restriction sites were synthesized by GeneArt (Thermo Fisher Scientific) and used to replace WT *RPL22* ORFs in the pVTU260 plasmid with the corresponding restriction enzymes.

To prepare the splicing reporters, we replaced the BamHI/EcoRI *COF1* insert in the pOG71 plasmid [39] with BamHI and EcoRI-digested products of PCR amplification with primers MO09 + MO10 for the *RPL22A* intron and primers MO11 + MO12 for the *RPL22B* intron using BY4741 genomic DNA as a template. These manipulations resulted in plasmids p423GPD-*RPL22A-CUP1* and p423GPD-*RPL22B-CUP1*, which were verified by restriction analysis and sequencing.

Vectors p3HR2 and pACT2 used in the yeast three-hybrid assays were donated by the Wickens Laboratory. To create hybrid proteins, intronless versions of *RPL22A*, *RPL22B*, and their RNA-binding mutants were re-cloned from the pVTU260-based expression vectors into the pACT2 vector using the NcoI and BamHI restriction sites. The intronic sequences were PCR-amplified from genomic DNA (strain BY4741) and cloned into the SphI site of vector p3HR2.

RNA isolation, reverse transcription and real-time PCR

RNA from cells grown to the mid-exponential phase in the YPAD medium was isolated using the MasterPure Yeast RNA Purification Kit (Epicentre Biotechnologies), including the DNase I treatment step, essentially according to the manufacturer's instructions. Two micrograms of RNA were converted to cDNA using RevertAid reverse transcriptase (Thermo Fisher Scientific) with random hexamer primers unless indicated otherwise. Real time-qPCR reactions were performed using the MESA GREEN qPCR MasterMix Plus for SYBR Assay No ROX (Eurogentec). All reactions were run in triplicate using the LightCycler 480 II (Roche). Relative pre-mRNA and mRNA quantities were calculated using the $\Delta\Delta C_t$ method [65]. For intron and gene replacement experiments, primers were designed in order to distinguish between the various forms of *RPL22* transcripts present in the cells. Specificities of the primer pairs used are listed in S5 Table. All primer pairs were tested for lack of (i) unspecific amplification under standard qPCR conditions and (ii) amplification of other related templates mentioned in S5 Table. The contribution of the second copy of *RPL22B* in the strain where the intron and exon 2 of *RPL22A* were replaced with the corresponding part of *RPL22B* was calculated as the difference between the relative abundances of total *RPL22B* mRNA (primers KA50 + JL385) and *RPL22B* mRNA transcribed from the *RPL22B* locus (JL360 + JL385).

The statistical analysis was performed on ΔC_t data using the t-test with correction for multiple testing. Statistical tests were conducted with the "R" statistical package version 3.2.3 (www.r-project.org/) using the `t.test()` function with parameters "paired = FALSE, alternative = 'two.sided' ". The function `p.adjust()` with Holm correction was used; $P < 0.05$ was considered significant.

Primer extension analysis of relative splicing efficiency

The analysis was performed according to the protocol described in [39]. Briefly, RNA was isolated using the MasterPure Yeast RNA Purification Kit (Epicentre Biotechnologies). Three to five micrograms of RNA were transcribed into cDNA using RevertAid reverse transcriptase (Thermo Fisher Scientific) with the YAC06 and YU14 [66] primers labeled using $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP and the T4 polynucleotide kinase (Promega). cDNA molecules were then separated on 8%

polyacrylamide gel with 7 M urea together with a Φ X174 HinfI DNA labeled marker. Radioactive signals were captured on Imaging Screen-K (BioRad) and detected using the Typhoon FLA imager (GE Healthcare Life Sciences).

Proteomic analysis

For mass spectrometry (MS) analysis, cells were grown in 50 ml of YPAD to the mid-exponential phase, collected by centrifugation (1000 g, 3 min), washed with 1 volume of water, frozen in liquid nitrogen, and stored at -80°C . Cells were disintegrated by 5 rounds of beating (20 s, speed 4, 5 min cooling between rounds) with glass beads in the FastPrep-24 instrument (MP Biomedicals) in 450 μl of 100 mM triethylammonium bicarbonate buffer with 1% sodium deoxycholate. Cell debris was removed from the lysate by centrifugation at 1000 g for 1 min at 4°C , followed by centrifugation at 2000 g for 5 min at 4°C ; the lysate was frozen and stored at -80°C . Peptides were generated by trypsin digestion, analyzed on Thermo Orbitrap Fusion (Q-OT-qIT, Thermo), and quantified using MaxQuant software (version 1.5.3.8) [67] in our core facility.

Yeast three-hybrid protein-RNA interaction testing

Interactions of Rpl22 proteins with their RNA ligands were assayed in the YBZ1 yeast strain as described in [68]. Transformants containing plasmids expressing the respective hybrid protein and target RNA were assayed for expression of the *HIS3* reporter gene by testing the ability of 10-fold serial dilutions of cell cultures to grow on selective media. To distinguish between interactions of different strength, activity of the *HIS3* reporter was assessed in the presence of a competitive inhibitor, 3-aminotriazole.

RNA structure modeling

For RNA structure modeling, RNAFold [69] was used with default settings, except for the temperature being set to 30°C .

Transcriptome profiling

Cells grown in the exponential phase for at least eight generations in YPAD medium at 30°C were harvested by centrifugation (1000 g, 3 min, room temperature); cell pellets were stored at -80°C . Cells were disrupted using glass beads in the FastPrep-24 instrument (MP Biomedicals) and total RNA was obtained using the acidic phenol:chloroform extraction method as described previously [70].

RNA was further purified with the MasterPure Yeast RNA Purification Kit (Epicentre Biotechnologies), starting with the DNase I treatment step. Strand-specific paired-end RNA-Seq libraries were constructed from poly(A)-enriched RNA samples by BGI Genomics using their standard procedure. RNA-Seq libraries were sequenced (100 nt, paired-end) by BGI Genomics using the Illumina HiSeq platform. Raw reads were filtered after sequencing, including the removal of adapter sequences, contamination, and low-quality reads. Three biological replicates were analyzed for each strain. The sequencing data are available in the ArrayExpress database (www.ebi.ac.uk/arrayexpress) under accession number E-MTAB-5275.

The quality of the sequencing reads was checked with fastQC 0.11.4 (www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc). Reads were aligned to the *S. cerevisiae* genome r64 using HISAT 2.0.3-beta [71]. Non-uniquely mapping reads (MAPQ < 10) were filtered out using samtools 1.3.1 [72]. Analysis of differential gene expression was performed using R 3.2.3 (www.r-project.org) and the Bioconductor package DESeq2 [73,74] at a 5% false discovery

rate. Significance of overlaps between lists of DEGs was determined by Fisher's exact test (function `fisher.test()`); antagonistic regulation of *rpl22bΔ* DEGs in the *rpl22aΔ* strain was tested by one-sided Wilcoxon signed rank test (function `wilcox.test()`). Splicing efficiency for each intron was calculated as described previously [75]. Briefly, transreads (reads spanning exon-exon junctions) were extracted using regtools 0.2.0 (<https://regtools.readthedocs.io>). Intron 5' end base coverage was determined using bedtools 2.25.0 [76]. Splicing efficiency was then calculated as the ratio of transreads (mRNA) to intron-end reads (pre-mRNA). Enriched GO categories were searched for using GO Term Finder 0.83 (<http://www.yeastgenome.org/cgi-bin/GO/goTermFinder.pl>).

Results

Introns in some, but not all, RPGs affect their gene expression under standard cultivation conditions

The roles of RPG paralogs in ribosome biogenesis and translation, both in unicellular eukaryotes and in Metazoa, remain an important issue [20]. We tested 7 pairs of paralogous gene pairs—*RPL22*, *RPL16*, *RPL37*, *RPL17*, *RPL2*, *RPS0*, and *RPS18*—previously reported to be regulated in an intergenic and intron-dependent way [23]. From diploid strains containing heterozygous intron deletions in each paralog, we prepared haploids lacking the intron in either the A paralog, B paralog, or in both and then assayed RPG mRNA abundance (Fig 1A). Intron deletions in all but two of the tested candidate pairs had little impact on expression levels of the manipulated gene or its paralog. Intron deletion in *RPL2A* led to a very strong inhibition of its own expression, which points to the existence of an intragenic regulatory loop, while intron deletions in *RPL22A/B* showed intergenic effects. Phenotypes of the intron-manipulated *RPL22* strains were reproducible across cultivation conditions (YPAD versus synthetic media), irrespective of the strain background (BY4741/BY4742 versus JPY101) or the number of generations between the inoculation and the collection of cells for analysis. Further analysis of additional environmental stresses and metabolic states may clarify the differences between our study and the previous results of Parenteau et al. [23]. Notably, there are also discrepancies between studies with regard to changes of intron deletions in the *RPS9* and *RPS14* paralogs [13,44,23]. In summary, while some paralog pairs display intron-dependent intergenic relationships, the roles of introns in other pairs may be less obvious and should not be simply inferred.

Introns mediate asymmetric intergenic regulation of the *RPL22A* and *RPL22B* paralogs by Rpl22 proteins

Because we were able to observe an intergenic relationship only with the *RPL22A/B* gene pair, we next concentrated on it. We prepared intronless versions of *RPL22A* and *RPL22B* in the BY4741 and BY4742 genetic backgrounds, compatible with yeast deletion collection [77]. As shown in Fig 1 and S1 Fig, the effects of *RPL22* intron deletions in the strains derived from BY4741 and BY4742 are in agreement with the results obtained using strains constructed by J. Parenteau [23]. The ratio of *RPL22A* to *RPL22B* mRNA abundance was 93 to 7 in WT (Fig 1B). Intron deletion from *RPL22A* (designated *rpl22aΔi*) led to a ~1.6-fold increase in *RPL22A* mRNA, accompanied by a dramatic (~19-fold) decrease of *RPL22B* mRNA. Removal of the intron from *RPL22B* (*rpl22bΔi*) enhanced the abundance of its own mRNA 5.4-fold, while *RPL22A* expression decreased 1.3-fold.

The expression of *RPL22A* did not differ considerably from the WT level when the *RPL22B* gene was deleted, but it did differ considerably when the *RPL22A* intron was also absent. On

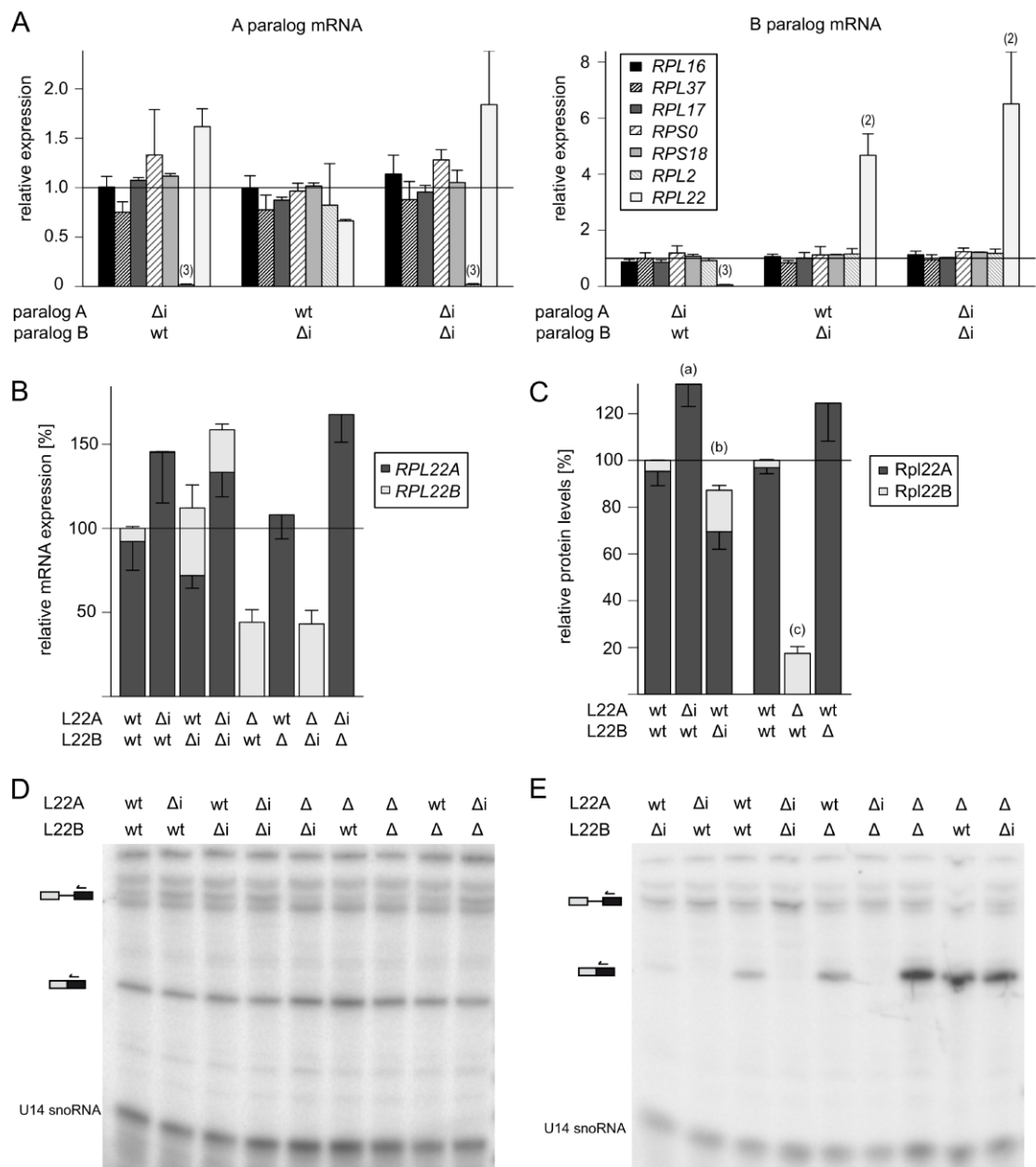


Fig 1. Introns mediate intergenic regulation of *RPL22* paralogs. (A) Impact of intron deletions on the expression of duplicated ribosomal protein genes. Transcript levels of *RPL16*, *RPL17*, *RPL37*, *RPS0* and *RPS18* paralogs are refractory to intron deletions. In contrast, *RPL22* and *RPL2A* show intergenic

and intragenic intron dependency, respectively. Plots show mean fold changes of "A" (a) and "B" (b) paralog mRNA in mutants with intron deletion (Δ) in "A", "B" or both paralogs as determined by RT-qPCR relative to WT. Data were normalized to *SPT15* expression and to the RNA level in WT cells. Error bars represent s.d. from two (*RPL17*, *RPS0*, *RPS18*) or three (*RPL2*, *RPL16*, *RPL37*) biological replicates. The statistical significance of the difference between WT strain and a strain bearing intron deletion is indicated as (2) for $P \leq 0.01$ and (3) for $P \leq 0.001$ based on the t-test with Holm correction for multiple testing (see *Methods*). Pre-cultures of colonies from freshly dissected spores were diluted to such a low OD so that they could undergo 10 generations before they were harvested at mid-exponential phase. In independent experiments, intron deletion mutants of *RPL22*, *RPL16* and *RPL37* were grown in YPAD or synthetic medium for 2 or 10 generations, respectively. The two cultivations gave essentially the same results as above (data not shown). (B) *RPL22* mRNAs are negatively regulated by their introns and respond in an intergenic way to the manipulations of their paralogous counterparts. The plot shows mRNA levels of *RPL22* paralogs normalized to WT. The *RPL22A* to *RPL22B* ratio was calculated from the same data as shown in *S1 Fig*. Mean values \pm s.d. from at least three biological replicates are shown (for details and statistical analysis, see *S1 Fig*). (C) Rpl22 protein levels reflect the changes in corresponding mRNAs. Relative protein levels were assessed based on mass spectra intensities measured from whole cell lysates. Mean values \pm s.d. from 3 biological replicates are shown. *P* values were obtained for comparisons of log-normalized protein intensities (Label Free Quantification Algorithm; MaxQuant, see *Methods*) between WT strain and a mutant strain using the t-test with Holm correction for multiple testing. Significant differences are indicated as (a) $P = 0.0182$ for Rpl22A (Rpl22B intensity was below detection limit), (b) $P = 0.0297/0.0026$ for Rpl22A/B, and (c) $P = 0.0006$ for Rpl22B. (D, E) Splicing efficiency analysis of *RPL22A* and *RPL22B* introns, respectively, in *RPL22*-manipulated strains. Gels show radioactively labeled primer extension products from cells expressing *RPL22A-CUP1* (D) and *RPL22B-CUP1* (E) reporter substrates. U14 snoRNA was used as a loading control. Each gel is representative of at least three independent experiments.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0190685.g001>

the other hand, removing *RPL22A* increased *RPL22B* mRNA to a similar abundance as in *rpl22b Δ* (40% of total *RPL22* mRNA in WT). Still, the level of total *RPL22* mRNA was lower in *rpl22a Δ* than in WT, which suggests that these cells are unable to attain the normal level of *RPL22* expression by transcription from the *RPL22B* locus alone. We also tested the levels of pre-mRNA in all the above strains (*S1 Fig*). mRNA downregulation of *RPL22A* and *RPL22B* in *rpl22b Δ* and *rpl22a Δ* , respectively, was not accompanied by dramatic increases in corresponding pre-mRNAs. In contrast, upregulation of *RPL22B* mRNA in *rpl22a Δ* , which apparently represents the maximum expression attainable from that locus, was accompanied by a drop in pre-mRNA levels.

To test whether mRNA levels would also be reflected in protein abundance, we analyzed the relative amounts of Rpl22A and Rpl22B proteins in strains with different *RPL22* alleles using mass spectrometry. The proteomic data corresponded to those for mRNA levels (compare *Fig 1B and 1C*). Rpl22A was the major Rpl22 protein in cells. Its abundance increased in cells where its gene did not contain an intron as well as in the *rpl22b Δ* strain where Rpl22B was missing. On the other hand, Rpl22B accounted only for 4% of the total Rpl22 level in the WT strain. However, when its intron-mediated regulation was abrogated, the Rpl22B level rose to $\sim 17.5\%$.

Both *RPL22* genes contain long introns (389 nt in *RPL22A*, 321 nt in *RPL22B*). The distance between the branch-point and 3' splice-site is longer in *RPL22A* (56 nt) than in *RPL22B* (17 nt). The two introns also differ in their donor site sequences, which both deviate from the GTATGT consensus: GTATGA in *RPL22A* and GTACGT in *RPL22B*. Interestingly, there is potential for a stable secondary structure (hairpin) to be formed between the branch-point and 3' splice site of the *RPL22A* intron (*S2 Fig*). However, when we prepared a strain from which the hairpin was removed (*rpl22a Δ H*), the levels of *RPL22* mRNAs and pre-mRNAs in that strain did not differ from WT (*S1 Fig*).

The asymmetric behavior of these introns led us to analyze the splicing efficiency of *RPL22*-derived splicing reporter constructs in strains with manipulated *RPL22* genes (*Fig 1D and 1E*). In these reporters, the strong constitutive GPD promoter drove transcription of exon 1 (including a part of 5'-UTR) followed by the intron and a part of exon 2 of either *RPL22A* or *RPL22B* fused to the *CUP1* gene. Using a primer extension, we observed high-efficiency *RPL22B* reporter splicing in strains from which the *RPL22A* paralog was absent (*Fig 1E*), which supports the hypothesis that Rpl22A stalls the expression of *RPL22B* by blocking the splicing step. This inhibition probably occurs during splice-site recognition or during the early steps of spliceosome assembly, as we did not observe any lariat-intermediate accumulation.

Indeed, splicing of the *RPL22B* reporter was inhibited in strains with intron deletion in *RPL22A* (i.e., with increased Rpl22A protein levels), whereas it was intermediate in WT. In contrast to *RPL22B*, the relative changes of *RPL22A* reporter mRNA accumulation were much less pronounced (Fig 1D). To summarize, we documented that *RPL22* introns inhibit expression of their genes, albeit to a different extent. Rpl22 protein levels corresponded with mRNA levels.

RPL22 pre-mRNAs are controlled by the nonsense-mediated decay pathway

Regardless of changes in mRNA quantity, *RPL22* pre-mRNA levels were mostly unaffected (S1 Fig). To determine which RNA degradation pathways would be involved in the metabolism of *RPL22* RNA species, we analyzed changes in mRNA and pre-mRNA levels of *RPL22A* and *RPL22B* in strains with deletions of genes involved in several RNA degradation pathways (Fig 2). Members of the TRAMP complex (*air1Δ*, *air2Δ*, *trf4Δ*, *trf5Δ*), exosome complex (*rrp6Δ*, *ski7Δ*, *hbs1Δ*), and THO/TREX complex (*swt1Δ*, *thp1Δ*, *thp2Δ*) did not affect the levels of *RPL22* RNA species. On the other hand, deletions of cytoplasmic nonsense-mediated decay (NMD) pathway members (*upf1Δ*, *upf2Δ*, and *upf3Δ*) and cytoplasmic 5'-3' exonuclease *xrn1Δ* increased pre-mRNA levels of *RPL22A* ~4 fold and *RPL22B* ~8 fold.

To obtain more detailed information about *RPL22* RNA metabolism, we analyzed double-mutant strains with a deletion of selected RNA surveillance genes (*air1Δ*, *air2Δ*, *dbp1Δ*, and *upf1Δ*) together with *RPL22* intron manipulations (S3 Fig). Impairment of the pathways in *air1Δ*, *air2Δ*, and *dbp1Δ* did not change the expression profiles of *RPL22* mRNAs and pre-mRNAs beyond the effect of intron manipulations. Importantly, *RPL22B* pre-mRNA was 8

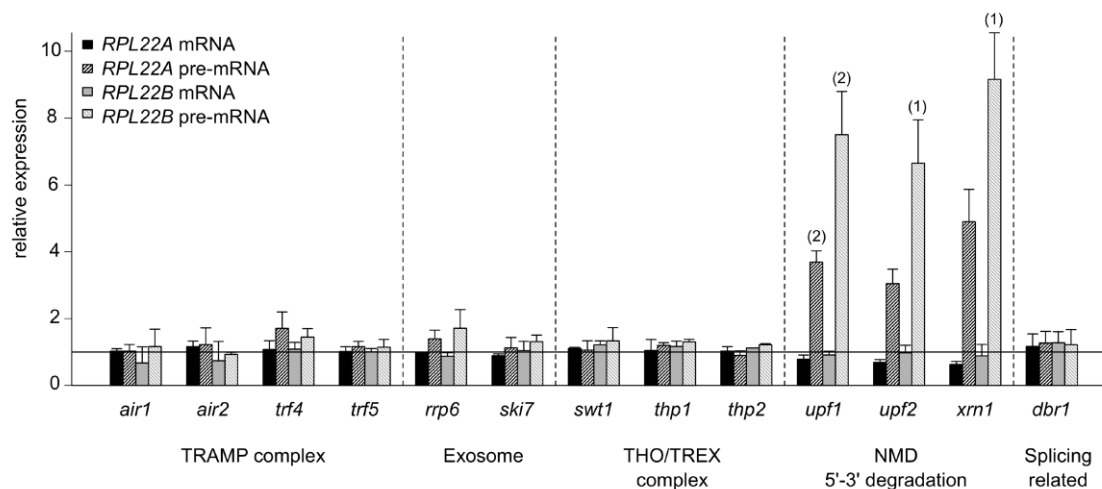


Fig 2. *RPL22* pre-mRNAs are targeted by the nonsense-mediated decay pathway. *RPL22A* and *RPL22B* expression was assessed by RT-qPCR (reverse transcription followed by quantitative PCR) in strains with deletion in genes representing various pathways of RNA metabolism. cDNA was prepared using random hexamers and oligo(dT) 18-mers. Values for each amplicon were normalized to WT levels and are represented by a horizontal line. The means of biological triplicates, quadruplicates (*air1Δ*), and duplicates (*ski7Δ*, *swt1Δ*, *thp1Δ*, and *thp2Δ*) are shown. The statistical significance of the difference between WT strain and a mutant strain is indicated as (1) for $P \leq 0.05$ and (2) for $P \leq 0.01$ based on the t-test with Holm correction for multiple testing (see Methods).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0190685.g002>

times more abundant in *rpl22aΔ upf1Δ* than in WT cells, even though *RPL22B* mRNA levels remained very low. This further supports the hypothesis that *RPL22B* pre-mRNA splicing is blocked by elevated levels of Rpl22.

We also took advantage of a mutant in splicing factor *PRP45* that causes pre-mRNA accumulation due to impaired spliceosome assembly [78]. We compared the effects of this splicing factor mutation (*prp45*(1–169)) with that of *upf1Δ*, *upf3Δ*, and *xrn1Δ* on pre-mRNA accumulation of *RPL22A/RPL22B*, *ECM33*, and *COF1* transcripts (S4 Fig). Unlike *ECM33*, where *prp45* (1–169) elicited ~6-fold pre-mRNA accumulation (NMD alleles had little effect), *RPL22B* showed the opposite behavior. The *RPL22A* response was intermediate. We suggest that these data reflect the low proportion of splicing events per pre-mRNA molecule generated from *RPL22B* as well as the dependence of *RPL22* metabolism on NMD. In summary, we suggest that both the NMD pathway and 5'-3' cytoplasmic degradation are responsible for pre-mRNA degradation of both *RPL22A* and *RPL22B* in WT cells.

Overexpression of Rpl22A/B, but not their mutant versions, downregulates the production of *RPL22* mRNAs in an intron-specific way

We attempted to manipulate *RPL22* mRNA levels by expressing the cDNA of each paralog from a multicopy plasmid under the control of the strong *ADHI* promoter. Increased levels of Rpl22A repressed *RPL22B* and *RPL22A* to approx. 10% and 50% of empty vector control, respectively. Rpl22B showed similar efficacies (Fig 3A, S6 Table). Intronless variants of *RPL22A/RPL22B* did not respond to the inhibitory effects of Rpl22A/Rpl22B overproduction, which confirms the intron requirement. To determine whether Rpl22 protein interaction with its primary transcript would be necessary for regulation, we used the same expression system to produce Rpl22 proteins mutated in their putative RNA-binding domain according to a previous study of human *RPL22* [64]. Production of these modified proteins (see S5 Fig) proved inconsequential to endogenous *RPL22* mRNA levels (Fig 3).

We confirmed the capacity of Rpl22 proteins to inhibit splicing using primer extension analysis in *rpl22aΔ-rpl22bΔ* double-mutant and WT strains. The strains carried the *RPL22B* splicing reporter and the expression plasmid with or without *RPL22A/RPL22B* cDNA. We observed high-efficiency splicing of the *RPL22B* reporter transcript in the *rpl22aΔ-rpl22bΔ* strain, which was strongly blocked by the ectopic production of either Rpl22A or Rpl22B, but not of their RNA-binding mutants (Fig 3B). The same effect was also observed in WT cells, albeit at a smaller amplitude because of the partial splicing block mediated by endogenous Rpl22. Stability of the expressed proteins was confirmed using Western blots (S5 Fig). These results show that introns exert inhibitory effects on *RPL22A* and *RPL22B* mRNA accumulation and that this effect depends on the level of Rpl22 protein(s).

Introns swapped between *RPL22* genes maintain their regulatory potential

To separate the effects of introns from the corresponding coding regions as well as sequences surrounding the locus, we transplanted introns between the *RPL22A* and *RPL22B* genes. Replacing the *RPL22A* intron with its *RPL22B* counterpart led to the decrease of *RPL22A* mRNA and the concomitant derepression of *RPL22B*. Reciprocal transplantation increased *RPL22B* mRNA (Fig 4, S7 Table), which indicates that the *RPL22A* intron confers less stringent inhibition. We then ectopically produced an excess of Rpl22 proteins to test the sensitivity of the chimeric genes to regulation. Overproduction of either Rpl22A or Rpl22B reduced the mRNA abundance of both endogenous *RPL22* genes. There was, however, a significant

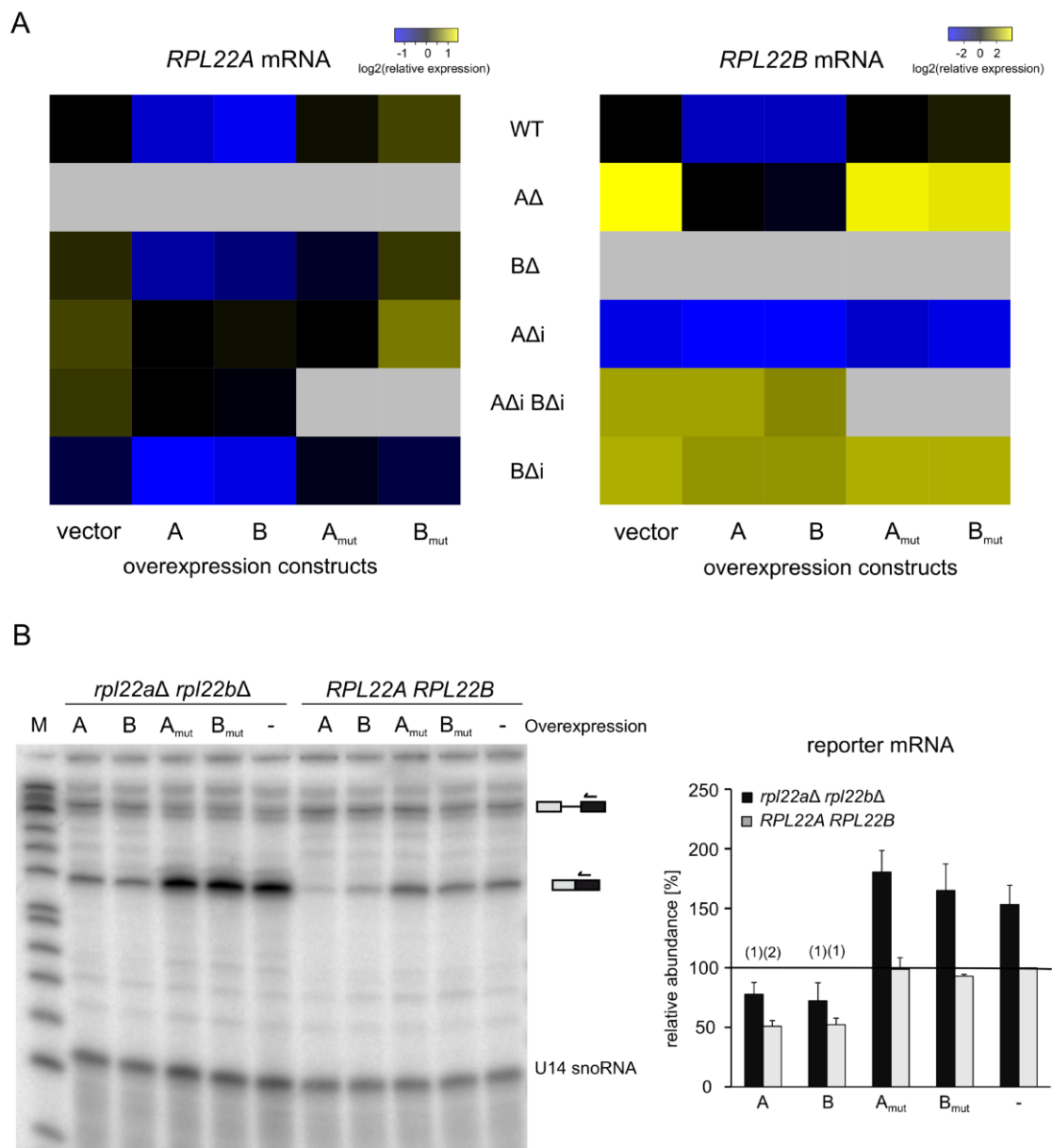


Fig 3. Overproduction of Rpl22A and Rpl22B, but not their mutant forms, downregulates endogenous *RPL22* mRNAs. (A) Heatmaps show endogenous mRNA abundances of *RPL22A* (left panel) and *RPL22B* (right panel) in the indicated genetic backgrounds (arranged in rows) with overexpression constructs (in columns). All values were normalized to WT with an empty vector (top left cell in each heatmap). Leftmost columns ("vector") reflect only the effect of genetic background. The A/B and A_{mut}/B_{mut} columns show the effect of overexpression of either WT or RNA binding mutants of

Rpl22A or Rpl22B. The “ Δi ”, “ $\Delta B i$ ”, and “ $\Delta i \Delta B i$ ” symbols denote strains lacking introns in one or both *RPL22* paralogs. Gray fields indicate that data were not determined. For details and statistical analysis see S6 Table. (B) Primer extension analysis of the relative splicing efficiency of a reporter derived from *RPL22B* (left panel). The effect of overproducing Rpl22A, Rpl22B, and their RNA-binding mutants was compared between a strain lacking endogenous *RPL22* genes and WT. The right panel shows the relative abundance of a spliced reporter mRNA signal normalized to the U14 snoRNA loading control and to the level of mRNA in WT cells with an empty vector. M is the DNA size marker. Error bars represent s.d. from 3 biological replicates. The statistical significance of the difference between empty vector strain and an overexpression strain is indicated as (1) for $P \leq 0.05$ and (2) for $P \leq 0.01$ based on the t-test with Holm correction for multiple testing (see Methods).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0190685.g003>

difference between the sensitivities of the genes containing the *RPL22A* and *RPL22B* introns. Regardless of the locus in which the gene resided and the identity of the coding region surrounding the intron, the presence of the *RPL22A* intron led to mRNA reduction of approx. 50%, while the *RPL22B* intron resulted in a drop of approximately 90% (Fig 4).

We also replaced the *RPL22A* gene (intron + exon 2) with a second copy of *RPL22B*. We took advantage of the fact that *RPL22* exon 1 codes only for 4 amino acids, identical between the paralogs; there is only 1 mismatch among the 12 nucleotides. Therefore, replacing intron

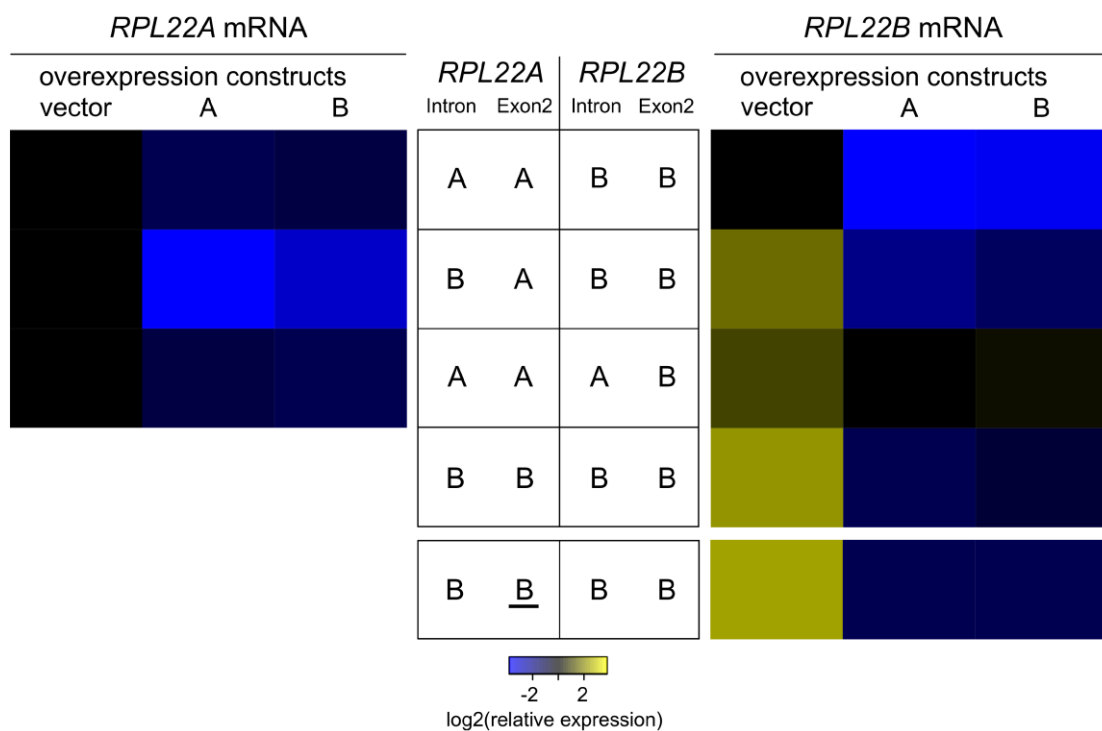


Fig 4. Introns determine the level of sensitivity of *RPL22* expression to downregulation. Heatmaps show endogenous mRNA abundances of *RPL22A* (left panel) and *RPL22B* (right panel) in five genetic backgrounds (arranged in rows) with overexpression constructs (in columns). Configurations of chimeras at the *RPL22A* and *RPL22B* loci are described for each row in the center. All values were normalized to the WT strain bearing an empty vector (top left cell in each heatmap). Leftmost columns (“vector”) reflect only the effect of genetic background, while A/B columns show the effect of overexpression. cDNA was prepared using random hexamers and oligo(dT) 18-mers. The primers used to detect *RPL22B* mRNA were specific for the transcript derived from the endogenous *RPL22B* locus. The detection of the *RPL22B* mRNA transcribed from the A locus (underlined) was accomplished using a specific set of primers (see last row of the right panel). For details and statistical analysis see S7 Table.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0190685.g004>

+ exon 2 (up to the stop codon) effectively swaps the whole coding region. The expression of recombinant *RPL22* was higher than that of the endogenous copy, apparently due to a stronger promoter of *RPL22A*. Irrespective of the expression level, both *RPL22B* genes responded to Rpl22A/Rpl22B overexpression in unison, producing mRNA in similar ratios between empty vector control and overexpression constructs (Fig 4). To reiterate, we confirm that introns determine the sensitivity of *RPL22* expression to Rpl22-mediated inhibition.

Rpl22 proteins interact with the *RPL22B* intron in a structured region downstream of 5'ss

Because the interrelationship between *RPL22* paralogs was intron- and protein-dependent, we examined some of the potential Rpl22-intron interactions using the yeast three-hybrid system (3H) [68]. We prepared constructs covering three separate regions of the *RPL22B* intron (see Fig 5) and tested their interaction with Rpl22 proteins as well as their RNA-binding mutants. As shown in Fig 5, we were able to detect the interaction of the "I2" region (nucleotides 165 to 236 of the *RPL22B* intron) with both Rpl22A and Rpl22B. The interaction was comparable in strength to iron regulatory protein 1 (IRP1), with the iron-responsive element (IRE) as the positive control [68]. Rpl22A/Rpl22B RNA-binding mutants, which were successfully produced in the reporter strain (see S6 Fig), did not show any interaction. We also attempted to express the whole *RPL22B* intron in the reporter strain, but no interaction was detected. We assume that because of the stretches of oligo-T, RNA was most likely not produced due to terminating RNA Pol III used in the three-hybrid system [79]. The inhibitory effect of Rpl22 on *RPL22B* pre-mRNA is thus most likely mediated by its binding to a structure within the 72nt region between 5'ss and BP.

Intron-mediated regulation of *RPL22* is conserved in *Kluyveromyces lactis*

Kluyveromyces lactis is a member of the "Saccharomyces complex" [8,80]. In contrast to the *Saccharomyces sensu stricto* complex taxa, its ancestor did not undergo WGD (see Introduction); *K. lactis* has only singleton RPGs in its genome [81]. We therefore wanted to investigate whether Rpl22 would be capable of regulating its splicing in *K. lactis*. We ectopically overproduced *K. lactis* Rpl22 (further referred to as KIRpl22) in *S. cerevisiae*. As shown in Fig 6A, the *K. lactis* protein repressed mRNA abundance of endogenous *RPL22A* and *RPL22B* to the same extent as if it were one of the *S. cerevisiae* paralogs. To achieve conditions more closely reflecting the physiological situation, we replaced the *RPL22A* gene (intron + exon 2) with the corresponding part of *KIRPL22*. If the *K. lactis* protein were unable to complement Rpl22A with regard to its inhibitory capacity, the outcome would be the upregulation of *RPL22B* mRNA. However, in this case *RPL22B* mRNA levels remained at the WT level (Fig 6B). After producing evidence that KIRpl22 is able to regulate *S. cerevisiae* *RPL22* genes, we addressed the question whether the exogenous gene could itself be regulated. The strain harboring *KIRPL22* in the *RPL22A* locus was transformed with pVTU260 plasmids overproducing either Rpl22A or Rpl22B. Each of the constructs led to the downregulation of *KIRPL22* mRNA to about 40%. In a strain lacking an intron (i.e., where the *RPL22A* intron and exon 2 were replaced by *KIRPL22* exon 2 only), overexpression of the Rpl22A or Rpl22B protein did not reduce *KIRPL22* mRNA abundance.

To prove that the mechanism of *RPL22* regulation is conserved in *K. lactis*, we investigated whether *KIRPL22* would respond to Rpl22 overproduction in *K. lactis* cells. We observed that plasmid-driven expression of *RPL22A*, *RPL22B*, and *KIRPL22* caused a reduction in *KIRPL22* mRNA levels (Fig 6D). Mutated versions of *RPL22A* or *RPL22B* had no effect, proving that the

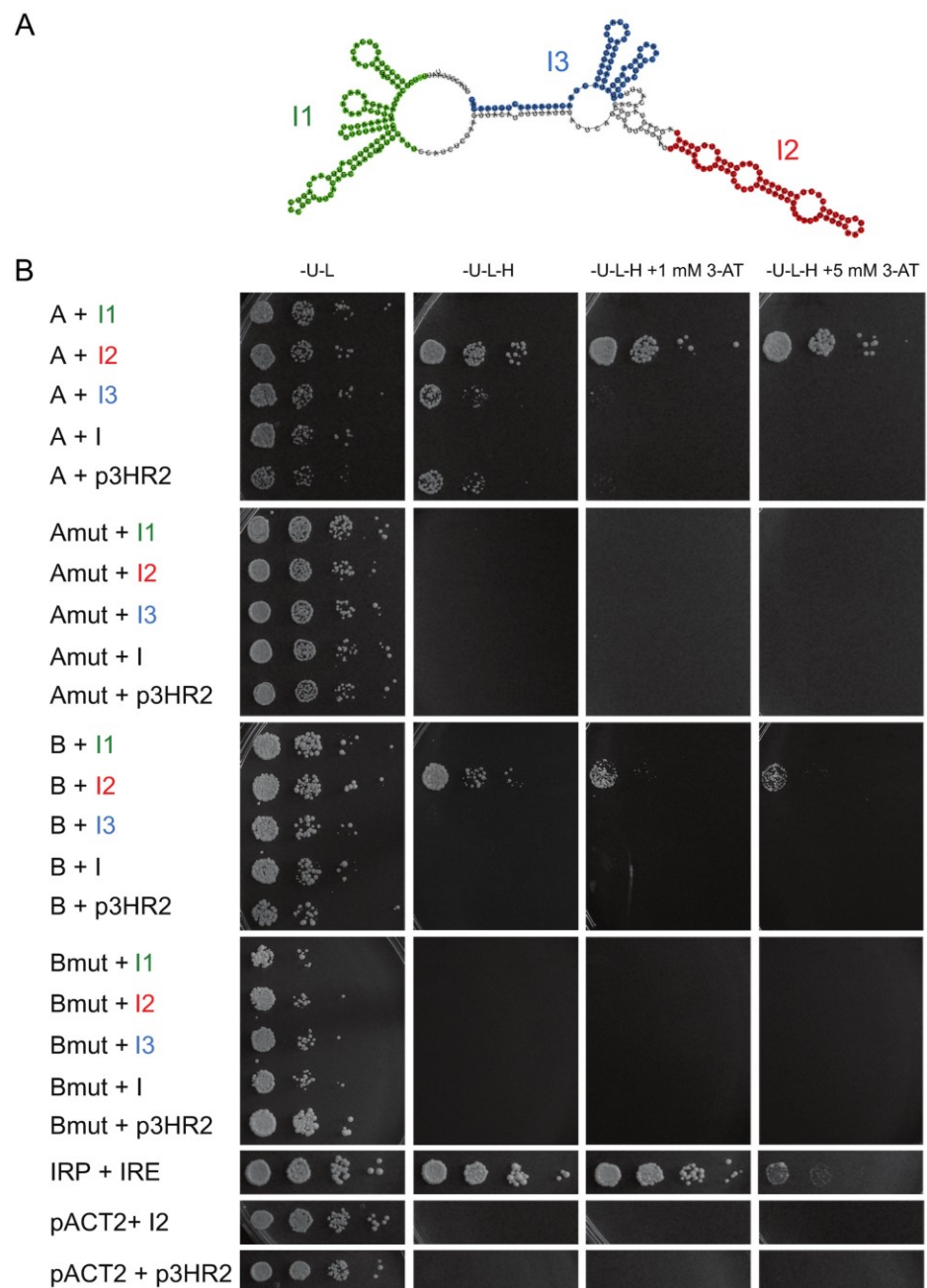


Fig 5. Rpl22A and Rpl22B interact with a specific region of the *RPL22B* intron. (A) RNAfold structure prediction of the *RPL22B* intron ("I"). Regions tested using the three-hybrid system are shown in color. The I1 region (green) represents nucleotides 11 to 123 of the *RPL22B* intron; I2 (red)—nt 165 to 236; I3 (blue)—nt 256 to 321. (B) Intron region 2 (I2) interacts with WT Rpl22A and Rpl22B but not with their RNA-binding mutants using the yeast three-hybrid system. *RPL22A* ("A") and *RPL22B* ("B") or their mutated versions ("Amut", "Bmut") in combination with different parts of the *RPL22B* intron were assayed for expression of the *HIS3* reporter gene, which is activated in the presence of protein-RNA interaction. 10-fold serial dilutions of cells were spotted on plates with increasing concentrations of 3-aminotriazole (3-AT). "-U", "-L", and "-H" denote the lack of uracil, leucine, and histidine in the medium. IRE and IRP served as positive controls. p3HR2 is the empty plasmid for bait RNA expression and pACT2 is the plasmid for expression of the Gal4 activation domain.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0190685.g005>

inhibition is dependent on the intact RNA-binding capacity of Rpl22. These results show that the *KIRPL22* singleton of *K. lactis* is capable of intragenic regulation.

Transcriptome analysis of *rpl22* mutants

We measured the impact of *RPL22* gene manipulations at the transcriptome level in order to determine other potential (non-*RPL22*) regulatory intron targets and paralogue-specific changes in mRNAs. We performed RNA-Seq analysis of transcriptomes from WT, *rpl22aΔ* and *rpl22bΔ* knock-out, and *rpl22aΔi* and *rpl22bΔi* intron deletion strains. The results are summarized in Fig 7. We observed a much more pronounced change in the transcriptome of *rpl22aΔ* compared to *rpl22bΔ* (1490 vs 186 significant differentially expressed genes (DEGs); Fig 7A and S8 Table). This is in accordance with the consensus that Rpl22A is the major paralogue, reflecting the severity of growth defects in the individual *rpl22* knock-out strains (the doubling times in YPD of *rpl22aΔ*, *rpl22bΔ*, and WT are 150.2 min, 90.2 min, and 90.7 min, respectively) [18]. When introns were deleted from the *RPL22* genes, 50 DEGs were identified in *rpl22aΔi*, but only 2 DEGs in *rpl22bΔi* (upregulated *RPL22B* and downregulated *RPL22A*; Fig 7A). Interestingly, manipulating the expression of the two *RPL22* paralogs had antagonistic effects on the transcriptome. These were partial, but significant, overlaps between DEGs upregulated in *rpl22aΔ* and DEGs downregulated in *rpl22bΔ*, and vice versa (Fig 7A). Furthermore, when we reviewed all 186 DEGs up- or downregulated in *rpl22bΔ* and examined their expression in *rpl22aΔ*, these genes typically showed antagonistic regulation between the two *rpl22* deletion strains (Fig 7B and 7C). The RNA-Seq data confirmed the dramatic increase of *RPL22B* mRNA in *rpl22aΔ* cells, but did not reveal additional genes as candidates for direct Rpl22A-dependent and intron-mediated inhibition.

We estimated the splicing efficiencies of endogenous *RPL22* genes from our RNA-Seq data using a method described previously [75]. The splicing efficiency changes in the manipulated strains were in agreement with qPCR measurements and splicing reporter results. Low levels of Rpl22 protein in *rpl22aΔ* facilitated unrestrained splicing of *RPL22B*, as also evidenced by lower pre-mRNA levels (see S1 Fig). Interestingly, this was accompanied by changes in the proportions of two alternatively spliced minor isoforms, which we identified in the RNA-Seq data (Fig 8B). The 5'ss-alternative isoform was produced with higher frequency in WT (where the splicing of *RPL22B* was partly inhibited) than in *rpl22aΔ* (where the inhibition was lifted). The 3'ss-alternative isoform, which shares 5'ss with the major product, behaved similarly to the major product. While the existence of these alternative isoforms (both of which contain STOP codons) has been reported previously [82], their differential behavior with respect to Rpl22 inhibition is here documented for the first time.

To better understand the specific processes affected by the Rpl22 paralogs, we performed GO enrichment analysis of the respective sets of up- and downregulated DEGs (S9 Table). We found that ribosome biogenesis genes were enriched both among DEGs upregulated in *rpl22aΔ* and among DEGs downregulated in *rpl22bΔ*. Also, DEGs upregulated in *rpl22bΔ* or *rpl22aΔi* were enriched for genes involved in sugar metabolism (mostly trehalose synthesis)

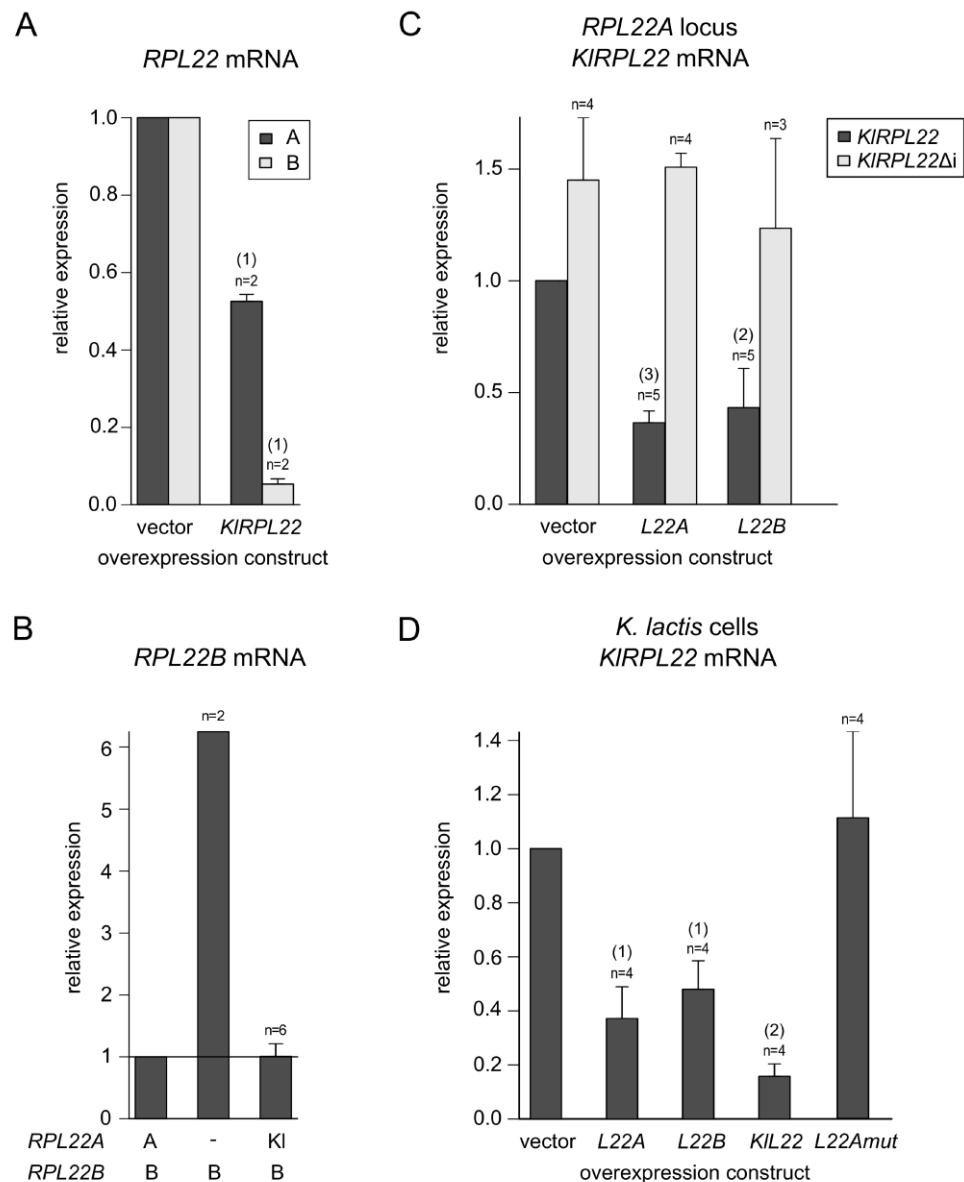


Fig 6. Splicing of *Kluyveromyces lactis* *RPL22* is subject to Rpl22-mediated inhibition in both *K. lactis* and *S. cerevisiae*. (A) *KIRPL22* expression in BY4741 cells leads to the downregulation of endogenous *RPL22* mRNAs to an extent similar to that observed for the overexpression of *RPL22A* and *RPL22B* (compare with Fig 3). (B) Negative regulation of *RPL22B* by Rpl22A is maintained when the *RPL22A* intron and exon 2 are replaced with the corresponding part of *KIRPL22*. (C) The abundance of *KIRPL22* mRNA expressed from the *RPL22A* locus as in (B) is decreased by the overproduction of either Rpl22A or Rpl22B. The intronless version of *KIRPL22* in the same locus does not respond to Rpl22A/B overexpression. (D) Endogenous *KIRPL22* mRNA is reduced by the ectopic

expression of *KIRPL22* as well as *RPL22A* and *RPL22B* in *K. lactis*. cDNA was prepared using random hexamers and oligo(dT) 18-mers. The statistical significance of the difference between empty vector strain and an overexpression strain is indicated as (1) for $P \leq 0.05$, (2) for $P \leq 0.01$, and (3) for $P \leq 0.001$ based on the t-test with Holm correction for multiple testing (see [Methods](#)).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0190685.g006>

and in phosphate metabolism. Furthermore, *rpl22a*Δ DEGs were specifically enriched for genes involved in mitochondrion organization (downregulated) and amino acid metabolism (upregulated). On the other hand, the deletion of *RPL22B* led to the upregulation of stress-response genes and the downregulation of factors important for ribosome biogenesis (different from those upregulated in *rpl22a*Δ; [Fig 8A](#)). The data suggest that the minor *RPL22B* acquired a paralog-specific role, as its deletion produces a distinct transcription phenotype at ~WT total *RPL22* levels.

Discussion

Deciphering the physiological significance of the RPG regulon of *S. cerevisiae* may contribute toward our understanding of how the underlying framework of the genome is used in evolutionary adaptations [83]. The selection of strains that best respond to the contradictory challenges of stressors and nutrients is perhaps the reason for the high retention rate of paralogs among yeast RPGs [3,84]. The panel of nuclear-encoded mitochondrial protein genes does not contain ohnologs [85,86]. The number of proteins translated in mitochondria is limited but, perhaps more importantly, it was the adaptation to anaerobic environments, such as insect guts, which drove this ohnolog-based strategy [81]. RPG transcripts differ markedly in their untranslated regions and the nucleotide diversity in the 5'-UTRs of RPGs is higher in comparison to housekeeping genes [20]. Duplicated genes contribute more resistance to deleterious mutations not only because the two alleles can substitute for each other, but also because the regulatory network is more able to respond by rewiring [87,88]. More variability in regulatory regions means a more diversified protein interactome [89] and better adaptivity of the network as a whole [90]. Such adaptations may require paralog pairs that differ only in regulatory parts of genes or by one or two amino acids, as is the case for 42 of the 59 RPG duplexes. One exciting possibility is that paralogous genes generate proteins that are paralog-specifically modified. Their posttranslational modifications may be executed differentially based on differences in untranslated regions and/or translation efficiencies between paralogous mRNAs [91]. Remarkably, human RPGs cannot substitute for their yeast counterparts [92] despite the high degree of amino acid sequence conservation, which suggests the existence of yeast-specific network-based adaptations. While the high retention rate of introns attests to their importance for organisms, the underlying reason for this retention warrants further research.

Intergenic regulation of *RPL22A/B* is splicing-mediated and asymmetric

We monitored mRNA and pre-mRNA levels in strains with various combinations of intron and whole gene deletions in *RPL22A* and *RPL22B* paralogs ([Fig 1](#)). While *RPL22A* mRNA ranged from 160% to 60% of WT, the amplitude for *RPL22B* was much larger (500% to 5% of *RPL22B* WT), which suggests that *RPL22B* concentration provides the “readout” for regulatory purposes. Our results are in agreement with the research carried out by Gabunilas and Chanfreau [59] and were obtained independently of their results using partially different methods.

Proteomic analysis of the manipulated strains shows here for the first time that Rpl22A/Rpl22B protein levels match the ratios of corresponding mRNAs ([Fig 1C](#)). Using splicing reporters ([Fig 1](#)) as well as knock-ins of chimeras in the *RPL22* loci ([Fig 4](#)), we demonstrate that splicing of the *RPL22B* intron is stringently regulated by Rpl22 levels, whereas the *RPL22A* reporter is much less sensitive ([Fig 1](#)). The reporters contained endogenous intron sequences

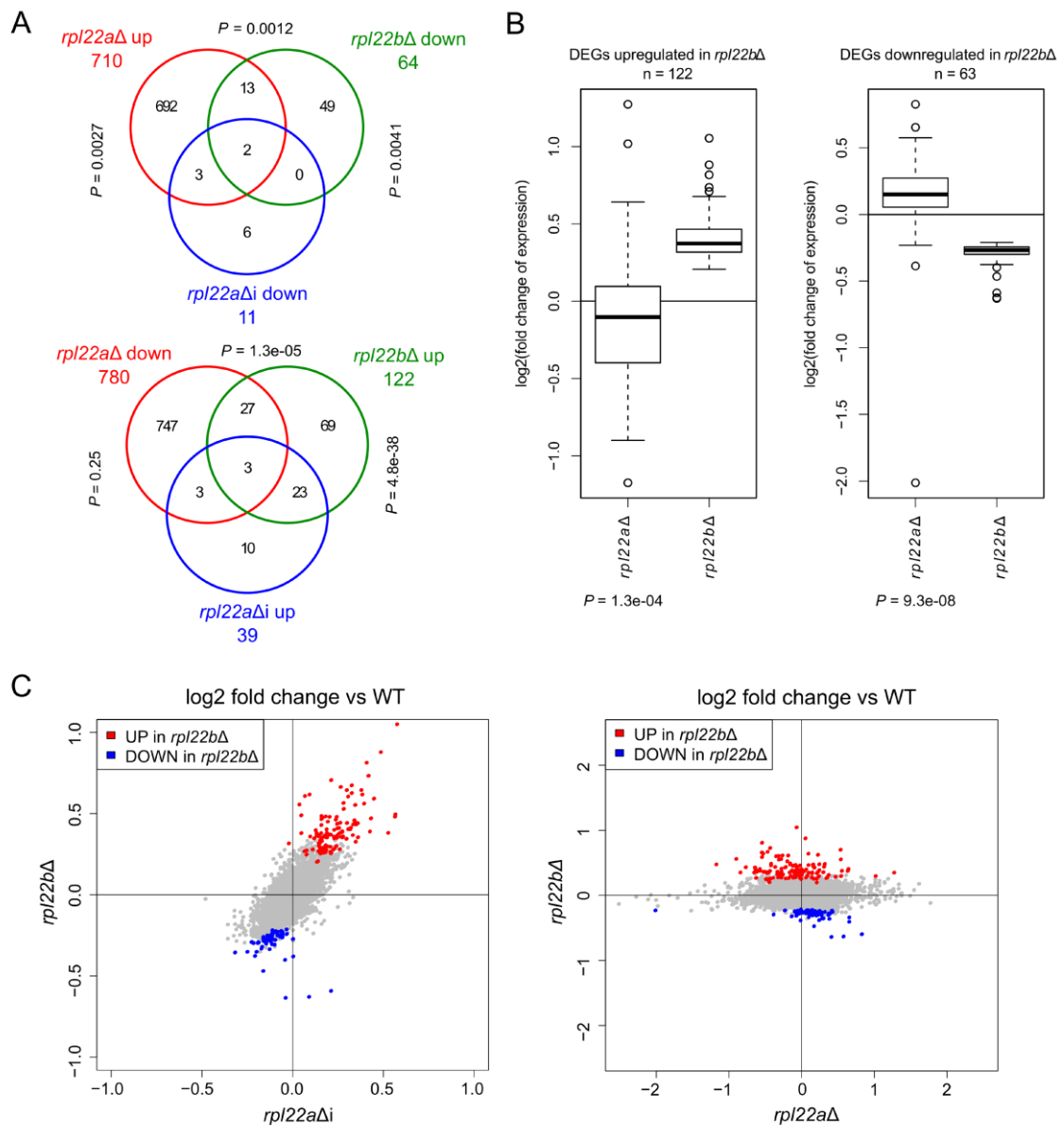


Fig 7. Transcriptome analysis of *RPL22* mutants. (A) Venn diagrams summarising numbers of differentially regulated genes (DEGs) in *RPL22* mutants as compared to WT and showing overlaps between selected sets of *RPL22* mutant DEGs. Overlap significance was determined by Fisher's exact test. (B) Genes significantly upregulated (left panel) or downregulated (right panel) in *rp122bΔ* typically show antagonistic regulation in *rp122aΔ*. Significance was determined by one-sided Wilcoxon signed rank test (*P* value is given below each *rp122aΔ* panel). Strain genotypes are indicated below the boxplots. The *RPL22B* gene itself was excluded from this analysis (right panel). (C) The DEGs downregulated in *rp122bΔ* as compared to WT (blue data points) are less affected in *rp122aΔ* than in *rp122bΔ*, however their expression changes in the same direction in both mutants. The fold change versus WT of this group of

DEGs thus correlates with the negative change of Rpl22B expression (0.1% in *rpl22aΔ* to zero in *rpl22bΔ*) but not with the change of total Rpl22 (see the right panel). The *RPL22A* and *RPL22B* genes themselves were excluded from this analysis.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0190685.g007>

as well as parts of 5'-UTR, exon 1, and part of exon 2. These results complement the data of Gabunilas and Chanfreau [59], where constructs used to measure splicing lacked alternative 5'ss and contained only intronic sequences. Our results are also in agreement with the conclusion that *RPL22A/B* regulation occurs at the pre-mRNA splicing step. This does not exclude the possibility that, under stress or under conditions affecting growth, more complex regulation (involving translation efficiency [55], or protein stability) takes place.

In exponentially growing WT cells, splicing of both paralogs is apparently subject to negative regulation by Rpl22 (Figs 1 and 3). Therefore, free Rpl22 concentration must be well above dissociation constant for *RPL22B* intron binding. Under conditions of balanced RP production and ribosome biogenesis, Rpl22 concentration in the nucleoplasm is determined by the pool of free Rpl22 [93] and by the affinities of Rpl22 for its binding sites on large subunits or their maturation stages. A sudden excess of free Rpl22 would mildly inhibit *RPL22A* splicing and further lower the expression of Rpl22B (i.e., the B/A ratio would become very low). According to our findings, this is the situation which affects the transcription of genes involved in ribosome biogenesis (Fig 8). It is possible that the fluctuations in free Rpl22 concentrations help to fine-tune ribosome assembly during disturbances caused by nutrition or environmental changes.

Intron mediated-regulation is insensitive to Rpl22A/B amino acid differences and both Rpl22 proteins may bind to a structured region between 5'ss and BP in the *RPL22B* intron when assayed in the yeast three-hybrid system (I2; Fig 5). In contrast, the 3'ss-proximal hairpin structure in the *RPL22A* intron (S2 Fig) had no role in splicing regulation (S1 Fig). In all instances documented thus far, the extraribosomal functions of Rpl22 (see Introduction) are mediated through RNA binding, most likely involving secondary transcript structures and the rRNA-binding domain of the protein. Human Rpl22 has been shown to bind to a broadly defined short hairpin loop (5'-NNNNG (N)₇ CUNNN-3') [94], which it can target within its own mRNA, the intron of Smad2, or the human Epstein Barr virus, EBER-1 RNA [48–50]. The secondary structures mediating Rpl22 inhibition in the *RPL22B* and *RPL22A* introns warrant further study. There is no obvious similarity to the rRNA structure or the SELEX motif identified for the human protein [94,95]. However, given the three-hybrid results (Fig 5) and the fact that RNA-binding mutants lack inhibitory potential (see Figs 3 and 4), there is a strong indication that intron RNA forms a structure that can be recognized by Rpl22. The situation may be more complex, as the structure can be complemented by other proteins or RNA, such as parts of the intron. Alternatively, it may comply with Rpl22-binding requirements, despite the lack of any apparent sequence similarity. Intriguingly, the intron-Rpl22 interaction specifically inhibited usage of the major, but not the minor, 5'ss (Fig 8B).

We observed ~4–8-fold increases in *RPL22A/RPL22B* pre-mRNA levels in the mutants defective for the cytoplasmic NMD pathway and 5'-3' degradation (Fig 2, S3 Fig). This indicates that *RPL22* pre-mRNAs are unable to compete for the splicing machinery in the presence of Rpl22. The data also imply that the inhibitory complexes containing the pre-mRNAs are stable until the time the pre-mRNAs are subjected to NMD in the cytoplasm. Our observations extend the data of Gabunilas and Chanfreau [59]. Unlike these authors, we observed no tendency for an increase of *RPL22* mRNA in the *XRN1* mutant, which may perhaps reflect the cultivation conditions-dependent availability of free Rpl22.

We summarize that splicing inhibition of *RPL22A/RPL22B* is operational at both introns, albeit to a different degree, and that it is dependent on Rpl22 RNA-binding propensity but

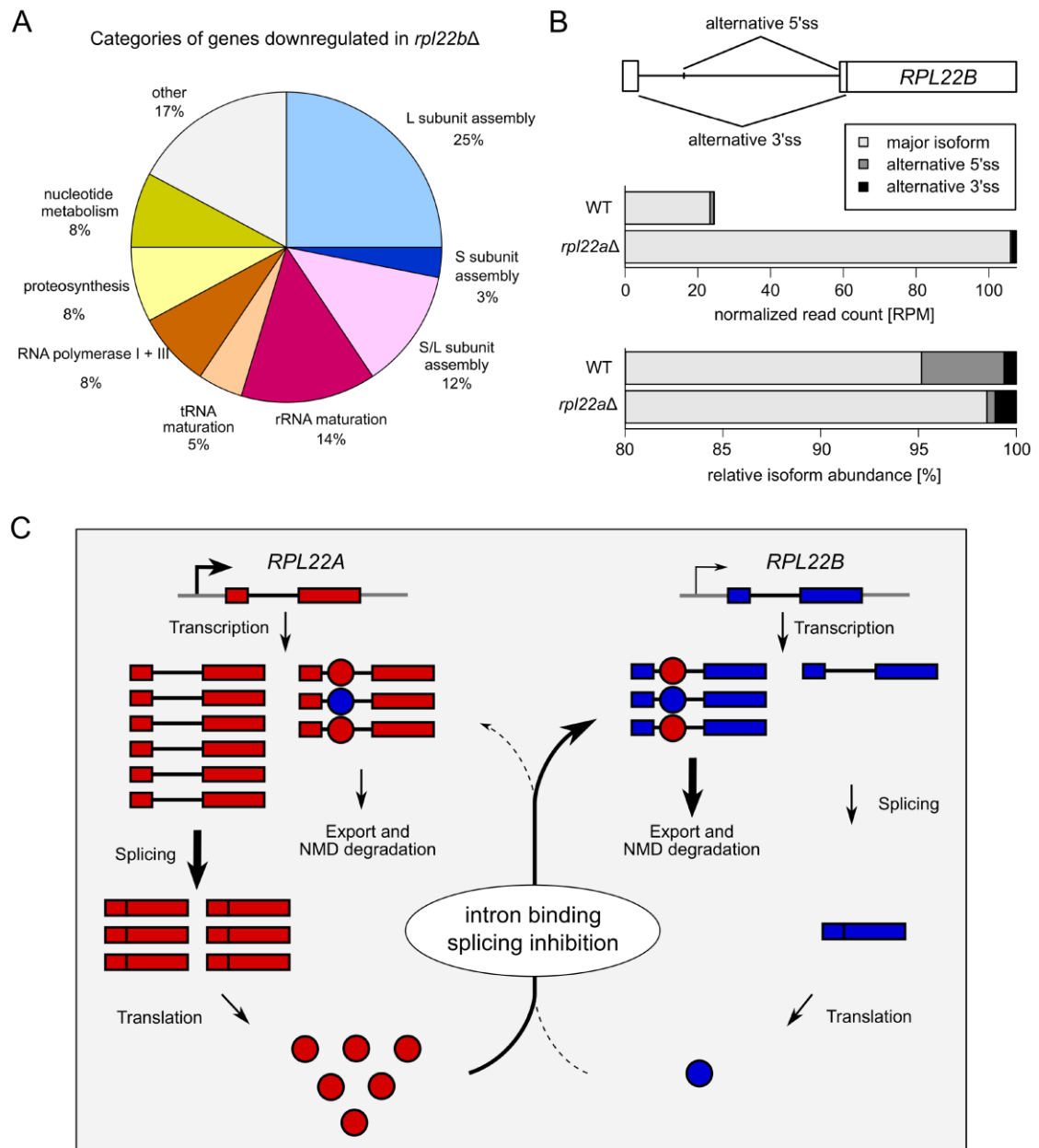


Fig 8. Intergenerically regulated *RPL22* paralogs may have differentiated roles. (A) Deletion of *RPL22B* has little effect on total *RPL22* levels but affects a subset of genes involved in ribosome biogenesis and proteosynthesis. (B) The scheme depicts alternative splice sites used in *RPL22B* pre-mRNA splicing. The upper plot shows read counts for each spliced *RPL22B* product, normalized to sequencing library sizes (RPM, reads per million). The lower plot shows

the percentage of each spliced isoform. Data from pooled samples, adjusted for the number of biological replicates, are shown (n WT = 4, n *rpl22a* = 3). (C) Model summarizing the regulatory interrelationship between *RPL22* paralogs. We assume that both Rpl22 proteins can inhibit splicing of either *RPL22A* or *RPL22B* pre-mRNA. Splicing of *RPL22B* pre-mRNA is much more sensitive to the inhibitory effect of Rpl22. This model represents the situation in WT cells, where Rpl22A is the major Rpl22 protein. Thus, its level contributes considerably to the splicing regulation of the minor *RPL22B* paralog but also partially to controlling its own expression. The Rpl22B level is low but can still provide minor regulation of its own as well as Rpl22A production.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0190685.g008>

independent of the differences in 19 amino acids between the Rpl22A and Rpl22B proteins. These results both support the conclusions drawn by Gabunilas and Chanfreau [59] and further extend their findings. We were able to demonstrate the effects of ectopically produced Rpl22A/B proteins in the *rpl22aΔbΔ* background. We also showed that RNA-binding mutant versions of Rpl22 are devoid of regulatory activity. Using the yeast three-hybrid system, we located Rpl22 binding to a region which overlaps with the fragment described by Gabunilas and Chanfreau [59].

Intron-dependent regulation of *S. cerevisiae* *RPL22* most likely evolved from autoregulation

Kluyveromyces lactis is part of the “*Saccharomyces* complex” (which did not undergo WGD) and has a single-copy *RPL22* homolog [8]. The alignment of *RPL22A*, *RPL22B*, and *KIRPL22* shows that all three introns share a common motif (S2 File, underlined), which is also present in the *RPL22* introns of other *Saccharomycotina* species (not shown; [59]). This motif (i) lies partly within the I2 construct that interacts with Rpl22 in the three-hybrid system (Fig 5) and (ii) borders the element important for splicing inhibition identified by Gabunilas and Chanfreau [59]. We assayed the regulatory properties of the *K. lactis* intron and protein in both *S. cerevisiae* and *K. lactis*. When the *K. lactis* intron was introduced together with exon 2 into the *S. cerevisiae* *RPL22A* locus, its splicing was repressed at high Rpl22 protein levels similar to the endogenous *RPL22A* intron. We also showed that while the KIRpl22 protein was capable of regulating *RPL22A* and *RPL22B* in *S. cerevisiae* (Fig 6A and 6B), Rpl22A/B as well as KIRpl22 inhibited splicing of *KIRPL22* in *K. lactis* (Fig 6D). These results prove that *K. lactis* *RPL22* may be regulated by an intragenic loop, whereby the KIRpl22 protein level modulates splicing of its own transcript. If we assume that a similar situation existed in the ancestor of *S. cerevisiae* before WGD, then, hypothetically, such autoregulation would have become intergenic and asymmetric after WGD (see Fig 8C). Therefore, the basis of the *RPL22* (auto)-regulatory mechanism is older than the difference between the *S. cerevisiae* Rpl22 proteins. We contend that Rpl22 acquired its intron-dependent function in the lineage ancestral to the “*Saccharomyces* complex”.

Rpl22A and B differ from KIRpl22 by 14 and 23 amino acids, respectively, and from each other by 19 amino acids, with most of the differences in the C-terminal part. The differences between A and B seem not to affect the capacity of the protein to inhibit splicing of either intron (see Figs 1, 3 and 4). KIRpl22, which is more similar to Rpl22A, is also capable of recognizing *S. cerevisiae* pre-mRNAs. The degree of inhibition of *KIRPL22* splicing is more similar to the responsiveness of *RPL22A* (to ~40%). We speculate that after WGD the expression of the genes eventually became asymmetric, turning *RPL22B* into a minor paralog. We also hypothesize that splicing-mediated regulation might have contributed to the establishment of the asymmetry. Apparently, only after the duplication was a stringent inhibition (of one of the introns) enabled. It is notable that both *RPL22A* and *RPL22B* contain the non-canonical 5' splice sequences, GTATGA and GTACGT, respectively, which are conserved across the *S. cerevisiae sensu stricto* group. The singleton *KIRPL22* contains a canonical site. A similar situation exists in the meiotic *MER1* regulon, where Mer1-regulated genes retain non-consensus splice sites

across the species of the group [96]. Another feature of asymmetry between *RPL22* paralogs is the presence of two Rap1 binding sites in their 5'-regulatory region. *RPL22B* apparently can only use one, as its 3'-proximal site has a C/A mutation of one of the two key cytosines within the binding consensus (CACCCATA_CAT [97]).

The regulation of *KIRPL22* poses a question whether the *K. lactis* singletons corresponding to the other regulated RPG pairs are always regulated in autogenic fashion. We intend to test this possibility in future experiments. While *RPL22A/B* pair and its kin might represent autogenic regulation turned intergenic, other RPs might have acquired their extraribosomal roles (i.e., RNA structures as binding partners) only after WGD. *RPL2A* (see Fig 1A), which seems to be regulated in a paralog-specific autogenic mode, is a candidate for such a scenario.

Genome-wide effects of *RPL22* manipulations

We were intrigued by the possibility of other nonribosomal-RNA regulatory targets for RPs [49]. Rpl22 may regulate the splicing of other introns, such as those of other RPGs, in addition to acting on its own gene and paralog. We therefore decided to compare transcriptome changes in situations with differing paralog ratios. While we did not find changes that would indicate additional intron-containing regulatory targets of Rpl22, our data illustrate the requirement of Rpl22 for ribosome biogenesis and also include DEGs involved in metabolism. They are also in partial agreement with previously reported Affymetrix expression microarray profiles of *rpl22aΔ* that include amino acid and carboxylic acid metabolism among the upregulated DEG categories [22]. Previously, Rpl22 has been implicated in cell-fate decisions in response to environmental signals [55]. Cells with reduced Rpl22 levels have been shown to exhibit a reduced 60S:40S particle ratio and accumulated "halfmers" on polysomes, which indicates that mRNA-bound 40S particles lack their 60S counterparts [58]. *RPL22A* is also among the RPs that affect the replicative lifespan and confer resistance to tunicamycin-induced ER stress [18].

Deletion of *RPL22B*, which leaves cells with A-only Rpl22 at the ~WT mRNA level, up-/downregulated 122/63 DEGs. We found this group of transcripts very interesting because they represent a response to the removal of the Rpl22B paralog without deviating from the ~WT Rpl22 level (Fig 1). The downregulated DEGs exhibited factors involved in the biogenesis of both ribosomal subunits, rRNA metabolism, subunits of RNA Pol I and III, nucleotide salvage and synthesis pathway genes, tRNA modification factors, and factors involved in proteosynthesis. The upregulated DEGs contained genes that are involved in stress response and metabolism, including nucleotide and carbohydrate metabolism. *RPL22A* intron deletion, which downregulates *RPL22B* and upregulates total *RPL22* concentration, yielded a substantial overlap with the *rpl22bΔ* phenotype (Fig 7A). Our data thus suggest that Rpl22B assumes a paralog-specific role that affects ribosome biogenesis.

RPG pairs coding for different protein isoforms can be used to modify ribosome composition and function (see Introduction). *RPL22* appears as a pair of paralogs in unrelated taxa analogically to, for example, *RPS9* [13]. In such cases, subfunctionalization involves proteins as well as UTRs and introns. The differences can affect Rpl22 functions during ribosome biogenesis and/or during translation within the large ribosomal subunit [22,25,58] or they may be related to the extraribosomal tasks of Rpl22 proteins.

Gabunilas and Chanfreau report that MMS-induced DNA stress or disruption of rRNA transcription causes splicing-mediated downregulation of *RPL22B* mRNA (and Rpl22B production) [59]. Such effects downregulate ribosome biogenesis, which should increase free Rpl22 levels and thus *RPL22B* inhibition (see the model in Fig 8C). The early response to oxidative stress may also involve changes in translation efficiency of specific transcripts that are

enriched for TTG (Leu) codons [55], including *RPL22A*. The translation effect is brought about by Tmr4 methyltransferase, which produces tRNA^{LEU(CAA)} with methylated C at the wobble position. This modification specifically potentiates anticodon-codon binding, thus enhancing the translation of some, albeit not all, TTG-enriched mRNAs [55,98]. While *RPL22A* is TTG enriched, *RPL22B* is not. In fact, *RPL22B* is the most distant codon-usage outlier of the cytoplasmic RPGs [99]. Hypothetically, the Rpl22A/B ratio may thus predetermine the amplitude and character of the reaction to oxidative stress. The immediate-early translation response requires *RPL22A* (and further enhances the excess of A over B). This should synergize with the inhibition of biogenesis (see Fig 8A). Restarted ribosome biogenesis should lead to decreased levels of RPs (including Rpl22) in the nucleoplasm, eventually unblocking *RPL22B* splicing. Increased Rpl22B should then further enhance ribosome biogenesis.

The extraribosomal roles of RPs [18,100] are far from widespread and not all RPs are equally suited for their tasks. Why is it that Rpl22 (or Rpl30, Rps9, among others [13,41]) binds its own transcript and regulates its splicing whereas other (RNA binding) RPs seem not to do so? We argue that due to the heavy constraint on the variability of the protein with respect to its ribosomal function, it must have been the variability on the RNA level which gave rise to Rpl22 binding structures in the transcriptome. This variability should be similar for all RPGs, however. Perhaps the discerning factor was the position of the protein in a key node that regulates ribosome biogenesis [4,101,102]. Such an intron-RP interaction would have been more likely to be fixed in cell population once its impact on splicing improved fitness [19,20]. Alternatively, it may have been the availability of the protein in the nucleoplasm, because of the association of the protein with the ribosome on its periphery or at a lower affinity, which made it available to sample other interactions (or “evolutionary opportunities” [103]). Evidence for the extraribosomal roles of Rpl22s in divergent taxa throughout evolution perhaps illustrates the exploitation of such opportunities [49,50,104]. It would be of interest to uncover more examples and to learn what predisposes their (re-)occurrence in organisms. Moreover, the regulated splicing of *RPL22A/RPL22B* (see Fig 8C) may serve as a model for establishing a regulatory relationship between two paralogous genes in evolution.

Supporting information

S1 Fig. *RPL22* paralogs show intron-dependent intergenic relationship. Plots show mean fold changes of mRNA and pre-mRNA levels of *RPL22A* (upper panel) and *RPL22B* (lower panel) relative to WT as determined by RT-qPCR. Data were normalized to the *SPT15* expression and to the RNA level in WT cells. n indicates the number of biological replicates and error bars represent s.d.; ND—not determined. This figure complements Fig 1. *P* values were obtained for comparisons between WT strain and a mutant strain using the t-test with Holm correction for multiple testing (see Methods). Only *P* < 0.05 (considered statistically significant) are indicated. (TIF)

S2 Fig. Secondary structures of *RPL22A* and *RPL22B* introns. (A) Structure of *RPL22A* intron. Bold line indicates the hairpin structure that forms between branch-point (BP; marked by *) and 3' splice site (3'ss; marked by arrow). Detailed view shows the structural prediction for the region between BP and 3'ss. Dashed line marks the position where the hairpin was ablated to generate the *rpl22aΔH* (Δ Hairpin) mutant. (B) Structure of *RPL22A* intron and the detail of BP to 3'ss region after hairpin removal (former hairpin position marked by dashed line). (C) Structure of *RPL22B* intron. All structures were predicted by RNAFold [1]. Color key represents the scale of positional entropy. Red color indicates high stability/probability of

the corresponding structure.
(TIF)

S3 Fig. *RPL22* expression in double mutant strains carrying *air1Δ*, *air2Δ*, *upf1Δ*, or *dbp1Δ* allele and *RPL22A/RPL22B* intron deletion. *RPL22* transcript levels in strains with deletion of *AIR1* (A), *AIR2* (B), *UPF1* (C) and *DBP1* (D) were determined by RT-qPCR. Plots show mean fold change of RNA expression normalized to *SPT15* transcript and WT. Error bars represent s.d. from biological replicates indicated by n.; ND—not determined. The statistical significance of the difference between WT strain and a mutant strain is indicated as (1) for $P \leq 0.05$, (2) for $P \leq 0.01$, and (3) for $P \leq 0.001$ based on the t-test with Holm correction for multiple testing (see [Methods](#)).
(TIF)

S4 Fig. Gene dependency of pre-mRNA accumulation in response to splicing and RNA degradation pathway mutations. (A) Truncation of the spliceosomal protein Prp45 [2] or deletions of components of the cytoplasmic 5'-3' RNA degradation pathways, and combinations of these mutations affect mRNA levels of *RPL22A*, *RPL22B*, *ECM33* and *COF1* genes only to a limited extent (with the exception of *xrn1Δ*, which lowers the mRNA level by up to 50% in some cases). (B) The extent of *RPL22A* and *RPL22B* pre-mRNA accumulation in strains mentioned above differs from that of *ECM33* and *COF1* genes. mRNA and pre-mRNA levels were measured by RT-qPCR with primers spanning exon-exon junctions or exon-intron junctions, respectively. Data were normalized to *TOM22* gene and expressed as mean fold change relative to WT level (indicated by a horizontal line). Error bars represent s.d. of two biological replicates for all *RPL22*-related analyses and for *ECM33*- and *COF1*-related analyses in *xrn1Δ* and *xrn1Δ prp45(1–169)* strains. In the remaining *ECM33*- and *COF1*-related measurements, error bars represent s.d. of 3 biological replicates. The statistical significance of the difference between WT strain and either *prp45(1–169)* strain or pooled data (indicated by horizontal bolts) of NMD mutants or NMD *prp45(1–169)* double mutants was analyzed by t-test with Holm correction for multiple testing (see [Methods](#)). Only $P < 0.05$ (considered statistically significant) are indicated.
(TIF)

S5 Fig. Western blots of Rpl22A/Rpl22B and their RNA binding mutants in the strains used in this study. Production of 6xHIS-tagged Rpl22 variants was confirmed by Western blot in strains used for the analyses of Rpl22 effect on *RPL22* RNA (A) expression, and (B) splicing efficiency by primer extension. Anti-PSTAIR antibody was used as a loading control.
(TIF)

S6 Fig. Western blots of Rpl22A/Rpl22B and their RNA binding mutant hybrid proteins produced in the three-hybrid YBZ1 strain. The production of Rpl22A, Rpl22B and their RNA binding mutants, fused with HA-Gal4 activation domain, was verified using Western blot analysis with anti-HA antibody. Hybrid proteins of 31 kDa (marked with arrow) were detected in extracts from all strains tested in three-hybrid system. M—protein size marker.
(TIF)

S1 Table. List of strains used in this study.
(XLSX)

S2 Table. List of oligonucleotides used in this study.
(XLSX)

S3 Table. List of plasmids used in this study.

(XLSX)

S4 Table. Combinations of oligonucleotides used for intron and/or gene replacements.

(XLSX)

S5 Table. Combinations of primers used for copy-specific detection of *RPL22* in intron and/or gene manipulated strains.

(XLSX)

S6 Table. Numeric rendering of heatmaps in Fig 3A.

(PDF)

S7 Table. Numeric rendering of heatmaps in Fig 4.

(PDF)

S8 Table. DEGs.

(XLS)

S9 Table. Go enrichment.

(XLS)

S1 File. Supplementary methods and references.

(DOCX)

S2 File. Alignment of *RPL22* introns and proteins from *S. cerevisiae* and *K. lactis*.

(DOCX)

Acknowledgments

We would like to thank Julie Parenteau (Université de Sherbrooke, Canada) for the yeast strains with RPG intron deletions, Michaela Oplová for the constructions of the splicing reporter plasmids, Anna Valentová for the strain constructions, the Wickens Laboratory (University of Wisconsin-Madison, USA) for plasmids and the strain used for yeast three-hybrid interaction testing, and Václav Vopálenský for the *Kluyveromyces lactis* strain. We would also like to acknowledge Karel Harant and Pavel Talacko from the Laboratory of Mass Spectrometry, Biocev, Charles University, Faculty of Science for proteomic and mass spectrometric analysis. We appreciate the expert technical assistance of Eva Krejlerová and Anežka Dědková.

Author Contributions

Conceptualization: Petr Folk.

Data curation: Martin Převorovský.

Formal analysis: Kateřina Abrahámová, Filip Nemčko, Jiří Libus, Martin Převorovský, Martina Hálová.

Funding acquisition: František Půta, Petr Folk.

Investigation: Kateřina Abrahámová, Filip Nemčko, Jiří Libus, Martina Hálová.

Methodology: Kateřina Abrahámová, Filip Nemčko, Jiří Libus, František Půta.

Software: Martin Převorovský.

Supervision: Petr Folk.

Validation: Kateřina Abbrhánová, Filip Nemčko, Jiří Libus, Martin Převorovský, Martina Hállová.

Visualization: Kateřina Abbrhánová, Filip Nemčko, Martin Převorovský, Martina Hállová.

Writing – original draft: Kateřina Abbrhánová, Filip Nemčko, Jiří Libus, Martin Převorovský, Petr Folk.

Writing – review & editing: Kateřina Abbrhánová, Filip Nemčko, Jiří Libus, Martin Převorovský, František Půta, Petr Folk.

References

- Warner JR. The economics of ribosome biosynthesis in yeast. *Trends Biochem Sci.* 1999; 24: 437–440. PMID: [10542411](#)
- Henras AK, Soudet J, G  rus M, Lebaron S, Caizergues-Ferrer M, Moug  n A, et al. The post-transcriptional steps of eukaryotic ribosome biogenesis. *Cell Mol Life Sci CMLS.* 2008; 65: 2334–2359. <https://doi.org/10.1007/s00018-008-8027-0> PMID: [18408888](#)
- Lempi  inen H, Shore D. Growth control and ribosome biogenesis. *Curr Opin Cell Biol.* 2009; 21: 855–863. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2009.09.002> PMID: [19796927](#)
- Woolford JL, Baserga SJ. Ribosome Biogenesis in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics.* 2013; 195: 643–681. <https://doi.org/10.1534/genetics.113.153197> PMID: [24190922](#)
- Sung M-K, Porras-Yakushi TR, Reitsma JM, Huber FM, Sweredoski MJ, Hoelz A, et al. A conserved quality-control pathway that mediates degradation of unassembled ribosomal proteins. *eLife.* 2016; 5: e19105. <https://doi.org/10.7554/eLife.19105> PMID: [27552055](#)
- Sung M-K, Reitsma JM, Sweredoski MJ, Hess S, Deshaies RJ. Ribosomal proteins produced in excess are degraded by the ubiquitin–proteasome system. *Mol Biol Cell.* 2016; 27: 2642–2652. <https://doi.org/10.1091/mbc.E16-05-0290> PMID: [27385339](#)
- Planta RJ, Mager WH. The list of cytoplasmic ribosomal proteins of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast.* 1998; 14: 471–477. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0061\(19980330\)14:5<471::AID-YEA241>3.0.CO;2-U](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0061(19980330)14:5<471::AID-YEA241>3.0.CO;2-U) PMID: [9559554](#)
- Wolfe KH, Shields DC. Molecular evidence for an ancient duplication of the entire yeast genome. *Nature.* 1997; 387: 708–713. <https://doi.org/10.1038/42711> PMID: [9192896](#)
- Byrne KP, Wolfe KH. The Yeast Gene Order Browser: Combining curated homology and syntenic context reveals gene fate in polyploid species. *Genome Res.* 2005; 15: 1456–1461. <https://doi.org/10.1101/gr.3672305> PMID: [16169922](#)
- Marcet-Houben M, Gabald  n T. Beyond the Whole-Genome Duplication: Phylogenetic Evidence for an Ancient Interspecies Hybridization in the Baker's Yeast Lineage. *PLoS Biol.* 2015; 13: e1002220. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002220> PMID: [26252497](#)
- Coulombe-Huntington J, Xia Y. Network Centrality Analysis in Fungi Reveals Complex Regulation of Lost and Gained Genes. *PLoS ONE.* 2017; 12: e0169459. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0169459> PMID: [28046110](#)
- Wapinski I, Pfeffer A, Friedman N, Regev A. Natural history and evolutionary principles of gene duplication in fungi. *Nature.* 2007; 449: 54–61. <https://doi.org/10.1038/nature06107> PMID: [17805289](#)
- Plocik AM, Guthrie C. Diverse forms of *RPS9* splicing are part of an evolving autoregulatory circuit. *PLoS Genet.* 2012; 8: e1002620. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002620> PMID: [22479208](#)
- Spingola M, Grate L, Haussler D, Ares M. Genome-wide bioinformatic and molecular analysis of introns in *Saccharomyces cerevisiae*. *RNA.* 1999; 5: 221–234. PMID: [10024174](#)
- Neuv  glise C, Marck C, Gaillardin C. The intronome of budding yeasts. *C R Biol.* 2011; 334: 662–670. <https://doi.org/10.1016/j.crv.2011.05.015> PMID: [21819948](#)
- Juneau K, Miranda M, Hillenmeyer ME, Nislow C, Davis RW. Introns Regulate RNA and Protein Abundance in Yeast. *Genetics.* 2006; 174: 511–518. <https://doi.org/10.1534/genetics.106.058560> PMID: [16816425](#)
- Ares M, Grate L, Pauling MH. A handful of intron-containing genes produces the lion's share of yeast mRNA. *RNA.* 1999; 5: 1138–1139. PMID: [10496214](#)
- Steffen KK, McCormick MA, Pham KM, MacKay VL, Delaney JR, Murakami CJ, et al. Ribosome Deficiency Protects Against ER Stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics.* 2012; 191: 107–118. <https://doi.org/10.1534/genetics.111.136549> PMID: [22377630](#)

19. Evangelisti AM, Conant GC. Nonrandom Survival of Gene Conversions among Yeast Ribosomal Proteins Duplicated through Genome Doubling. *Genome Biol Evol.* 2010; 2: 826–834. <https://doi.org/10.1093/gbe/evq067> PMID: 20966100
20. Yadav A, Radhakrishnan A, Panda A, Singh A, Sinha H, Bhanot G. The Modular Adaptive Ribosome. *PLoS ONE.* 2016; 11: e0166021. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0166021> PMID: 27812193
21. Bergkessel M, Whitworth GB, Guthrie C. Diverse environmental stresses elicit distinct responses at the level of pre-mRNA processing in yeast. *RNA.* 2011; 17: 1461–1478. <https://doi.org/10.1261/ma.2754011> PMID: 21697354
22. Komili S, Farny NG, Roth FP, Silver PA. Functional Specificity among Ribosomal Proteins Regulates Gene Expression. *Cell.* 2007; 131: 557–571. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.08.037> PMID: 17981122
23. Parenteau J, Durand M, Morin G, Gagnon J, Lucier J-F, Wellinger RJ, et al. Introns within Ribosomal Protein Genes Regulate the Production and Function of Yeast Ribosomes. *Cell.* 2011; 147: 320–331. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.08.044> PMID: 22000012
24. Gilbert WV. Functional specialization of ribosomes? *Trends Biochem Sci.* 2011; 36: 127–132. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2010.12.002> PMID: 21242088
25. Mauro VP, Edelman GM. The Ribosome Filter Redux. *Cell Cycle.* 2007; 6: 2246–2251. <https://doi.org/10.4161/cc.6.18.4739> PMID: 17890902
26. Shi Z, Barna M. Translating the Genome in Time and Space: Specialized Ribosomes, RNA Regulons, and RNA-Binding Proteins. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2015; 31: 31–54. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-100814-125346> PMID: 26443190
27. Shi Z, Fujii K, Kovary KM, Genuth NR, Röst HL, Teruel MN, et al. Heterogeneous Ribosomes Preferentially Translate Distinct Subpools of mRNAs Genome-wide. *Mol Cell.* 2017; 67: 71–83.e7. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.05.021> PMID: 28625553
28. Rudra D, Mallick J, Zhao Y, Warner JR. Potential Interface between Ribosomal Protein Production and Pre-rRNA Processing. *Mol Cell Biol.* 2007; 27: 4815–4824. <https://doi.org/10.1128/MCB.02062-06> PMID: 17452446
29. Albert B, Knight B, Merwin J, Martin V, Ottoz D, Gloor Y, et al. A Molecular Titration System Coordinates Ribosomal Protein Gene Transcription with Ribosomal RNA Synthesis. *Mol Cell.* 2016; 64: 720–733. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.10.003> PMID: 27818142
30. Fermi B, Bosio MC, Dieci G. Promoter architecture and transcriptional regulation of Abf1-dependent ribosomal protein genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.* 2016; 44: 6113–6126. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw194> PMID: 27016735
31. Pleiss JA, Whitworth GB, Bergkessel M, Guthrie C. Rapid, transcript-specific changes in splicing in response to environmental stress. *Mol Cell.* 2007; 27: 928–937. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.07.018> PMID: 17889666
32. Vilardell J, Shaoqing JY, Warner JR. Multiple functions of an evolutionarily conserved RNA binding domain. *Mol Cell.* 2000; 5: 761–766. PMID: 10882112
33. Parker R, Patterson B. Architecture of fungal introns: implications for spliceosome assembly. In: Inouye M, Dudock BS, editors. *Molecular biology of RNA: new perspectives.* San Diego: Academic Press; 1987.
34. Goguel V, Rosbash M. Splice site choice and splicing efficiency are positively influenced by pre-mRNA intramolecular base pairing in yeast. *Cell.* 1993; 72: 893–901. PMID: 8458083
35. Lin C-L, Taggart AJ, Fairbrother WG. RNA structure in splicing: An evolutionary perspective. *RNA Biol.* 2016; 13: 766–771. <https://doi.org/10.1080/15476286.2016.1208893> PMID: 27454491
36. Raker VA, Mironov AA, Gelfand MS, Pervouchine DD. Modulation of alternative splicing by long-range RNA structures in *Drosophila*. *Nucleic Acids Res.* 2009; 37: 4533–4544. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp407> PMID: 19465384
37. Singh NN, Singh RN, Androphy EJ. Modulating role of RNA structure in alternative splicing of a critical exon in the spinal muscular atrophy genes. *Nucleic Acids Res.* 2006; 35: 371–389. <https://doi.org/10.1093/nar/gkl1050> PMID: 17170000
38. Rogic S, Montpetit B, Hoos HH, Mackworth AK, Ouellette BF, Hieter P. Correlation between the secondary structure of pre-mRNA introns and the efficiency of splicing in *Saccharomyces cerevisiae*. *BMC Genomics.* 2008; 9: 355. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-355> PMID: 18664289
39. Gahura O, Hammann C, Valentová A, Půta F, Folk P. Secondary structure is required for 3' splice site recognition in yeast. *Nucleic Acids Res.* 2011; 39: 9759–9767. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr662> PMID: 21893588
40. Dabeva MD, Post-Beittenmiller MA, Warner JR. Autogenous regulation of splicing of the transcript of a yeast ribosomal protein gene. *Proc Natl Acad Sci.* 1986; 83: 5854–5857. PMID: 3526341

41. Dabeva MD, Warner JR. Ribosomal protein L32 of *Saccharomyces cerevisiae* regulates both splicing and translation of its own transcript. *J Biol Chem*. 1993; 268: 19669–19674. PMID: [8366109](#)
42. Macias S, Bragulat M, Tardiff DF, Vilardell J. L30 Binds the Nascent *RPL30* Transcript to Repress U2 snRNP Recruitment. *Mol Cell*. 2008; 30: 732–742. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.05.002> PMID: [18570876](#)
43. Vilardell J, Warner JR. Regulation of splicing at an intermediate step in the formation of the spliceosome. *Genes Dev*. 1994; 8: 211–220. PMID: [8299940](#)
44. Fewell SW, Woolford JL. Ribosomal Protein S14 of *Saccharomyces cerevisiae* Regulates Its Expression by Binding to *RPS14B* Pre-mRNA and to 18S rRNA. *Mol Cell Biol*. 1999; 19: 826–834. <https://doi.org/10.1128/MCB.19.1.826> PMID: [9858605](#)
45. Petibon C, Parenteau J, Catala M, Elela SA. Introns regulate the production of ribosomal proteins by modulating splicing of duplicated ribosomal protein genes. *Nucleic Acids Res*. 2016; 3878–91. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw140> PMID: [26945043](#)
46. Zhang Y, Duc A-CE, Rao S, Sun X-L, Bilbee AN, Rhodes M, et al. Control of Hematopoietic Stem Cell Emergence by Antagonistic Functions of Ribosomal Protein Paralogs. *Dev Cell*. 2013; 24: 411–425. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2013.01.018> PMID: [23449473](#)
47. Kearse MG, Chen AS, Ware VC. Expression of ribosomal protein L22e family members in *Drosophila melanogaster*: rpl22-like is differentially expressed and alternatively spliced. *Nucleic Acids Res*. 2011; 39: 2701–2716. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq1218> PMID: [21138957](#)
48. O'Leary MN, Schreiber KH, Zhang Y, Duc A-CE, Rao S, Hale JS, et al. The Ribosomal Protein Rpl22 Controls Ribosome Composition by Directly Repressing Expression of Its Own Paralog, Rpl22l1. *PLoS Genet*. 2013; 9: e1003708. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003708> PMID: [23990801](#)
49. Zhang Y, O'Leary MN, Peri S, Wang M, Zha J, Melov S, et al. Ribosomal Proteins Rpl22 and Rpl22l1 Control Morphogenesis by Regulating Pre-mRNA Splicing. *Cell Rep*. 2017; 18: 545–556. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.12.034> PMID: [28076796](#)
50. Houmani JL, Davis CI, Ruf IK. Growth-Promoting Properties of Epstein-Barr Virus EBER-1 RNA Correlate with Ribosomal Protein L22 Binding. *J Virol*. 2009; 83: 9844–9853. <https://doi.org/10.1128/JVI.01014-09> PMID: [19640998](#)
51. Le S, Sternglanz R, Greider CW. Identification of Two RNA-binding Proteins Associated with Human Telomerase RNA. *Mol Biol Cell*. 2000; 11: 999–1010. <https://doi.org/10.1091/mbc.11.3.999> PMID: [10712515](#)
52. Dai M-S, Shi D, Jin Y, Sun X-X, Zhang Y, Grossman SR, et al. Regulation of the MDM2-p53 pathway by ribosomal protein L11 involves a post-ubiquitination mechanism. *J Biol Chem*. 2006; 281: 24304–24313. <https://doi.org/10.1074/jbc.M602596200> PMID: [16803902](#)
53. Cao B, Fang Z, Liao P, Zhou X, Xiong J, Zeng S, et al. Cancer-mutated ribosome protein L22 (RPL22/eL22) suppresses cancer cell survival by blocking p53-MDM2 circuit. *Oncotarget*. 2017; 8: 90651. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.21544> PMID: [29207594](#)
54. Rao S, Lee S-Y, Gutierrez A, Perrigoue J, Thapa RJ, Tu Z, et al. Inactivation of ribosomal protein L22 promotes transformation by induction of the stemness factor, Lin28B. *Blood*. 2012; 120: 3764–3773. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-03-415349> PMID: [22976955](#)
55. Chan CTY, Pang YLJ, Deng W, Babu IR, Dyavaiah M, Begley TJ, et al. Reprogramming of tRNA modifications controls the oxidative stress response by codon-biased translation of proteins. *Nat Commun*. 2012; 3: 937. <https://doi.org/10.1038/ncomms1938> PMID: [22760636](#)
56. Delaney JR, Ahmed U, Chou A, Sim S, Carr D, Murakami CJ, et al. Stress profiling of longevity mutants identifies Afg3 as a mitochondrial determinant of cytoplasmic mRNA translation and aging. *Aging Cell*. 2013; 12: 156–166. <https://doi.org/10.1111/ace.12032> PMID: [23167605](#)
57. An J, Kwon H, Kim E, Lee YM, Ko HJ, Park H, et al. Tolerance to acetic acid is improved by mutations of the TATA-binding protein gene. *Environ Microbiol*. 2015; 17: 656–669. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12489> PMID: [24761971](#)
58. Kim SJ, Strich R. Rpl22 is required for *IME1* mRNA translation and meiotic induction in *S. cerevisiae*. *Cell Div*. 2016; 11: <https://doi.org/10.1186/s13008-016-0024-3>
59. Gabunilas J, Chanfreau G. Splicing-Mediated Autoregulation Modulates Rpl22p Expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS Genet*. 2016; 12: e1005999. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005999> PMID: [27097027](#)
60. Gietz RD, Schiestl RH. High-efficiency yeast transformation using the LiAc/SS carrier DNA/PEG method. *Nat Protoc*. 2007; 2: 31–34. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.13> PMID: [17401334](#)
61. Storici F, Lewis LK, Resnick MA. In vivo site-directed mutagenesis using oligonucleotides. *Nat Biotechnol*. 2001; 19: 773–776. <https://doi.org/10.1038/90837> PMID: [11479573](#)

62. Längle-Rouault F, Jacobs E. A method for performing precise alterations in the yeast genome using a recyclable selectable marker. *Nucleic Acids Res.* 1995; 23: 3079–3081. PMID: [7659536](#)
63. Heinisch JJ, Buchwald U, Gottschlich A, Heppeler N, Rodicio R. A tool kit for molecular genetics of *Kluyveromyces lactis* comprising a congenic strain series and a set of versatile vectors: *Kluyveromyces lactis* molecular tool kit. *FEMS Yeast Res.* 2010; 10: 333–342. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2009.00604.x> PMID: [20522115](#)
64. Houmani JL, Ruf IK. Clusters of Basic Amino Acids Contribute to RNA Binding and Nucleolar Localization of Ribosomal Protein L22. *PLoS ONE.* 2009; 4: e5306. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005306> PMID: [19390581](#)
65. Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc.* 2008; 3: 1101–1108. PMID: [18546601](#)
66. Siatecka M, Reyes JL, Konarska MM. Functional interactions of Prp8 with both splice sites at the spliceosomal catalytic center. *Genes Dev.* 1999; 13: 1983–1993. PMID: [10444596](#)
67. Cox J, Hein MY, Luber CA, Paron I, Nagaraj N, Mann M. Accurate Proteome-wide Label-free Quantification by Delayed Normalization and Maximal Peptide Ratio Extraction, Termed MaxLFQ. *Mol Cell Proteomics.* 2014; 13: 2513–2526. <https://doi.org/10.1074/mcp.M113.031591> PMID: [24942700](#)
68. SenGupta DJ, Zhang B, Kraemer B, Pochart P, Fields S, Wickens M. A three-hybrid system to detect RNA-protein interactions in vivo. *Proc Natl Acad Sci.* 1996; 93: 8496–8501. PMID: [8710898](#)
69. Lorenz R, Bernhart SH, Höner zu Siederdissen C, Tafer H, Flamm C, Stadler PF, et al. ViennaRNA Package 2.0. *Algorithms Mol Biol.* 2011; 6: 26. <https://doi.org/10.1186/1748-7188-6-26> PMID: [22115189](#)
70. Swaminathan S, Masek T, Molin C, Pospisek M, Sunnerhagen P. Rck2 Is Required for Reprogramming of Ribosomes during Oxidative Stress. *Mol Biol Cell.* 2006; 17: 1472–1482. <https://doi.org/10.1091/mbc.E05-07-0632> PMID: [16381815](#)
71. Kim D, Langmead B, Salzberg SL. HISAT: a fast spliced aligner with low memory requirements. *Nat Methods.* 2015; 12: 357–360. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3317> PMID: [25751142](#)
72. Li H, Handsaker B, Wysoker A, Fennell T, Ruan J, Homer N, et al. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics.* 2009; 25: 2078–2079. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp352> PMID: [19505943](#)
73. Love MI, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* 2014; 15: 550. <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8> PMID: [25516281](#)
74. Huber W, Carey VJ, Gentleman R, Anders S, Carlson M, Carvalho BS, et al. Orchestrating high-throughput genomic analysis with Bioconductor. *Nat Methods.* 2015; 12: 115–121. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3252> PMID: [25633503](#)
75. Převorovský M, Hálová M, Abrahámová K, Libus J, Folk P. Workflow for Genome-Wide Determination of Pre-mRNA Splicing Efficiency from Yeast RNA-seq Data. *BioMed Res Int.* 2016; 2016: 1–9. <https://doi.org/10.1155/2016/4783841> PMID: [28050562](#)
76. Quinlan AR. BEDTools: the Swiss-army tool for genome feature analysis. *Curr Protoc Bioinformatics* 2014; 47: 11.12.1–11.12.34. <https://doi.org/10.1002/0471250953.bi1112s47> PMID: [25199790](#)
77. Winzler EA, Shoemaker DD, Astromoff A, Liang H, Anderson K, Andre B, et al. Functional characterization of the *S. cerevisiae* genome by gene deletion and parallel analysis. *Science.* 1999; 285: 901–906. PMID: [10436161](#)
78. Hálová M, Gahura O, Převorovský M, Cit Z, Novotný M, Valentová A, et al. Nineteen complex-related factor Prp45 is required for the early stages of cotranscriptional spliceosome assembly. *RNA.* 2017; ma-061986.
79. Geiduschek EP, Tocchini-Valentini GP. Transcription by RNA polymerase III. *Annu Rev Biochem.* 1988; 57: 873–914. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.57.070188.004301> PMID: [3052292](#)
80. Kurtzman CP, Robnett CJ. Phylogenetic relationships among yeasts of the ‘*Saccharomyces* complex’ determined from multigene sequence analyses. *FEMS Yeast Res.* 2003; 3: 417–432. [https://doi.org/10.1016/S1567-1356\(03\)00012-6](https://doi.org/10.1016/S1567-1356(03)00012-6) PMID: [12748053](#)
81. Scannell DR, Butler G, Wolfe KH. Yeast genome evolution—the origin of the species. *Yeast.* 2007; 24: 929–942. <https://doi.org/10.1002/yea.1515> PMID: [17621376](#)
82. Kawashima T, Douglass S, Gabunilas J, Pellegrini M, Chanfreau GF. Widespread Use of Non-productive Alternative Splice Sites in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS Genet.* 2014; 10: e1004249. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004249> PMID: [24722551](#)
83. Mattenberger F, Sabater-Muñoz B, Toft C, Fares MA. The Phenotypic Plasticity of Duplicated Genes in *Saccharomyces cerevisiae* and the Origin of Adaptations. *GenesGenomesGenetics.* 2017; 7: 63–75. <https://doi.org/10.1534/g3.116.035329> PMID: [27799339](#)

84. Halbeisen RE, Gerber AP. Stress-Dependent Coordination of Transcriptome and Translatome in Yeast. *PLoS Biol.* 2009; 7: e1000105. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000105> PMID: 19419242
85. Amunts A, Brown A, Bai X, Ll  cer JL, Hussain T, Emsley P, et al. Structure of the Yeast Mitochondrial Large Ribosomal Subunit. *Science.* 2014; 343: 1485–1489. <https://doi.org/10.1126/science.1249410> PMID: 24675956
86. Desai N, Brown A, Amunts A, Ramakrishnan V. The structure of the yeast mitochondrial ribosome. *Science.* 2017; 355: 528–531. <https://doi.org/10.1126/science.aal2415> PMID: 28154081
87. Patra B, Kon Y, Yadav G, Sevdal AW, Frumkin JP, Vallabhajosyula RR, et al. A genome wide dosage suppressor network reveals genomic robustness. *Nucleic Acids Res.* 2017; 45: 255–270. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw1148> PMID: 27899637
88. Zhang J. Evolution by gene duplication: an update. *Trends Ecol Evol.* 2003; 18: 292–298. [https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(03\)00033-8](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(03)00033-8)
89. Freeberg MA, Han T, Moresco JJ, Kong A, Yang Y-C, Lu ZJ, et al. Pervasive and dynamic protein binding sites of the mRNA transcriptome in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genome Biol.* 2013; 14: R13. <https://doi.org/10.1186/gb-2013-14-2-r13> PMID: 23409723
90. Dong D, Yuan Z, Zhang Z. Evidences for increased expression variation of duplicate genes in budding yeast: from cis- to trans- regulation effects. *Nucleic Acids Res.* 2011; 39: 837–847. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq874> PMID: 20935054
91. Segev N, Gerst JE. Specialized ribosomes and specific ribosomal protein paralogs control translation of mitochondrial proteins. *J Cell Biol.* 2017; jcb.201706059. <https://doi.org/10.1083/jcb.201706059> PMID: 29118025
92. Kachroo AH, Laurent JM, Yellman CM, Meyer AG, Wilke CO, Marcotte EM. Systematic humanization of yeast genes reveals conserved functions and genetic modularity. *Science.* 2015; 348: 921–925. <https://doi.org/10.1126/science.aaa0769> PMID: 25999509
93. Kulak NA, Pichler G, Paron I, Nagaraj N, Mann M. Minimal, encapsulated proteomic-sample processing applied to copy-number estimation in eukaryotic cells. *Nat Methods.* 2014; 11: 319–324. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2834> PMID: 24487582
94. Dobbstein M, Shenk T. In vitro selection of RNA ligands for the ribosomal L22 protein associated with Epstein-Barr virus-expressed RNA by using randomized and cDNA-derived RNA libraries. *J Virol.* 1995; 69: 8027–8034. PMID: 7494316
95. Ben-Shem A, Loubresse NG de, Melnikov S, Jenner L, Yusupova G, Yusupov M. The Structure of the Eukaryotic Ribosome at 3.0   Resolution. *Science.* 2011; 334: 1524–1529. <https://doi.org/10.1126/science.1212642> PMID: 22096102
96. Venkataramanan S, Douglass S, Galivanche AR, Johnson TL. The chromatin remodeling complex Swi/Snf regulates splicing of meiotic transcripts in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.* 2017; 45: 7708–7721. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx373> PMID: 28637241
97. Knight B, Kubik S, Ghosh B, Bruzzone MJ, Geertz M, Martin V, et al. Two distinct promoter architectures centered on dynamic nucleosomes control ribosomal protein gene transcription. *Genes Dev.* 2014; 28: 1695–1709. <https://doi.org/10.1101/gad.244434.114> PMID: 25085421
98. Weissenbach J, Dirheimer G. Pairing properties of the methylester of 5-carboxymethyl uridine in the wobble position of yeast tRNA^{Arg}. *Biochim Biophys Acta BBA-Nucleic Acids Protein Synth.* 1978; 518: 530–534.
99. Lin K, Kuang Y, Joseph JS, Kolatkar PR. Conserved codon composition of ribosomal protein coding genes in *Escherichia coli*, *Mycobacterium tuberculosis* and *Saccharomyces cerevisiae*: lessons from supervised machine learning in functional genomics. *Nucleic Acids Res.* 2002; 30: 2599–2607. PMID: 12034849
100. Warner JR, McIntosh KB. How Common Are Extraribosomal Functions of Ribosomal Proteins? *Mol Cell.* 2009; 34: 3–11. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.03.006> PMID: 19362532
101. Konikkat S, Woolford JL. Principles of 60S ribosomal subunit assembly emerging from recent studies in yeast. *Biochem J.* 2017; 474: 195–214. <https://doi.org/10.1042/BCJ20160516> PMID: 28062837
102. Pratte D, Singh U, Murat G, Kressler D. Mak5 and Ebp2 Act Together on Early Pre-60S Particles and Their Reduced Functionality Bypasses the Requirement for the Essential Pre-60S Factor Nsa1. *PLoS ONE.* 2013; 8: e82741. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0082741> PMID: 24312670
103. Sharov AA. Evolutionary constraints or opportunities? *Biosystems.* 2014; 123: 9–18. <https://doi.org/10.1016/j.biosystems.2014.06.004> PMID: 25047708
104. Ni J-Q, Liu L-P, Hess D, Rietdorf J, Sun F-L. *Drosophila* ribosomal proteins are associated with linker histone H1 and suppress gene transcription. *Genes Dev.* 2006; 20: 1959–1973. <https://doi.org/10.1101/gad.390106> PMID: 16816001

Fig. S1

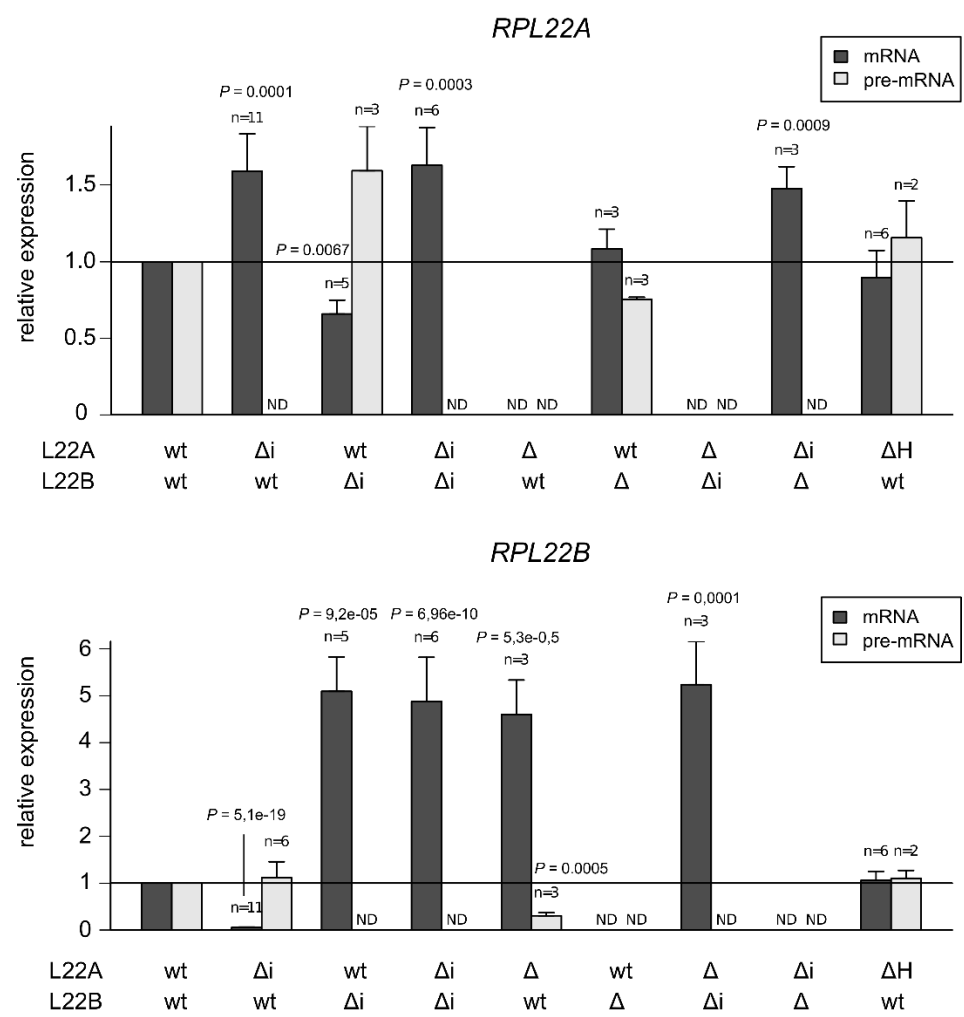


Fig. S2

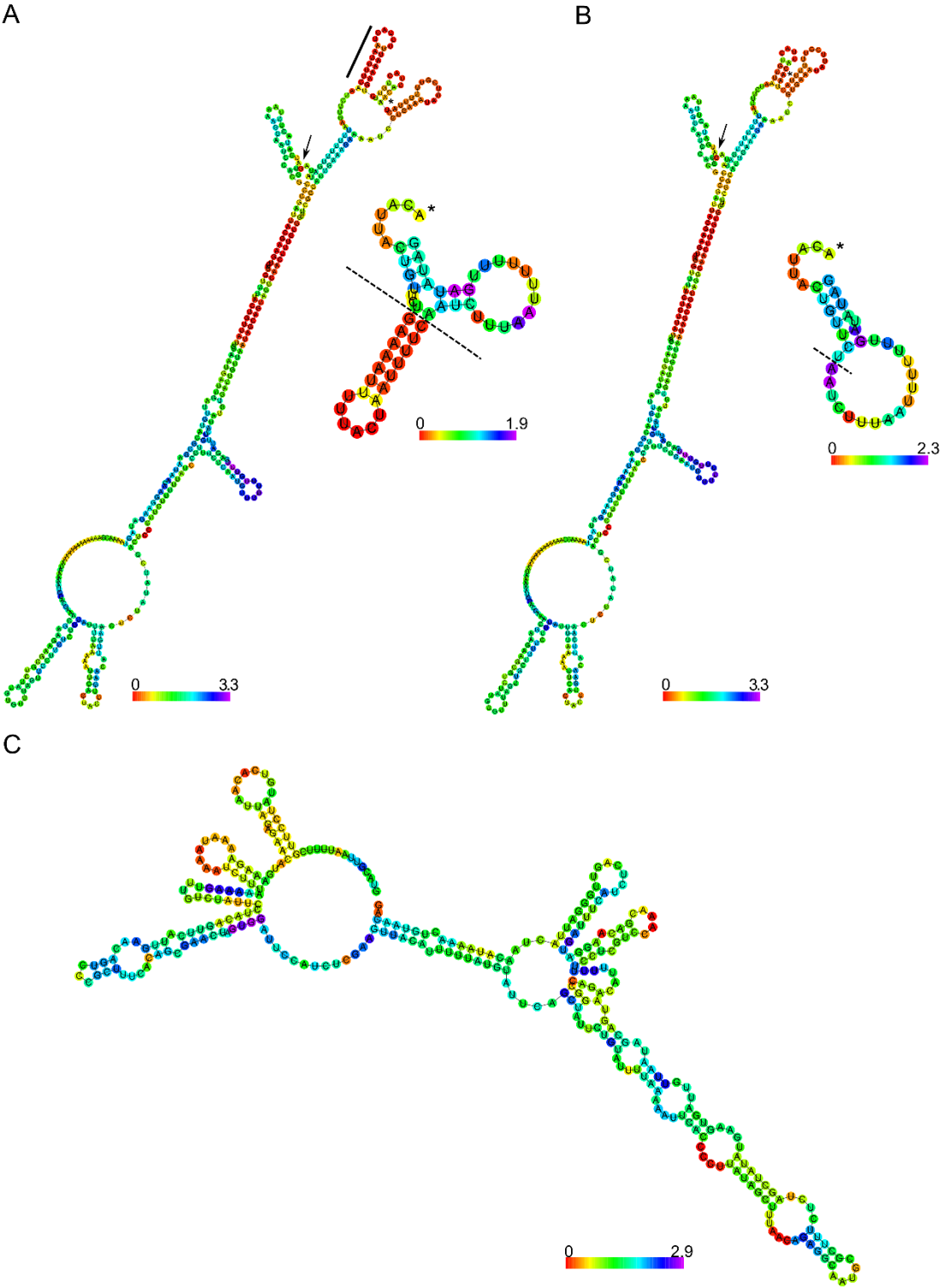


Fig. S3

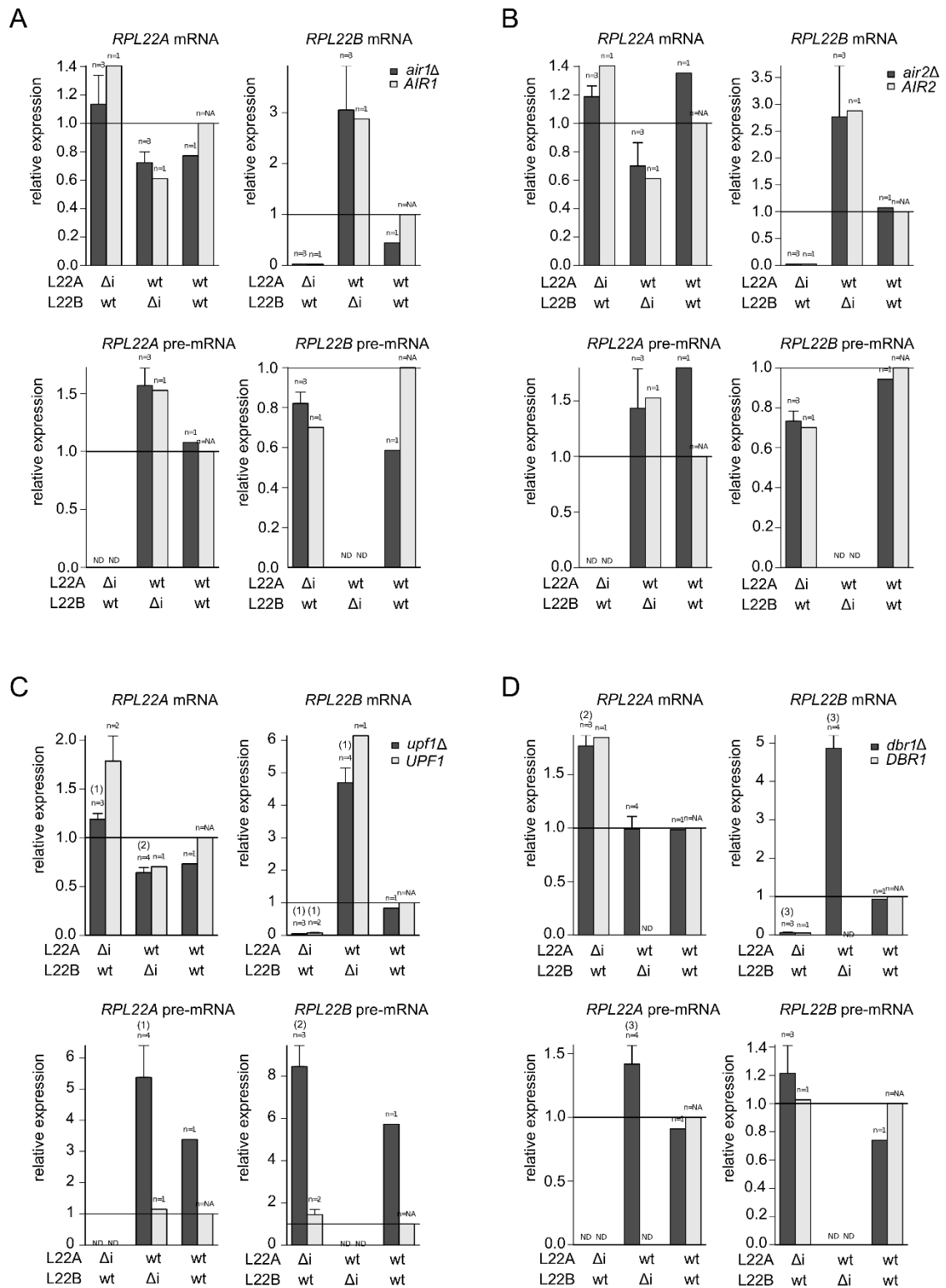


Fig. S4

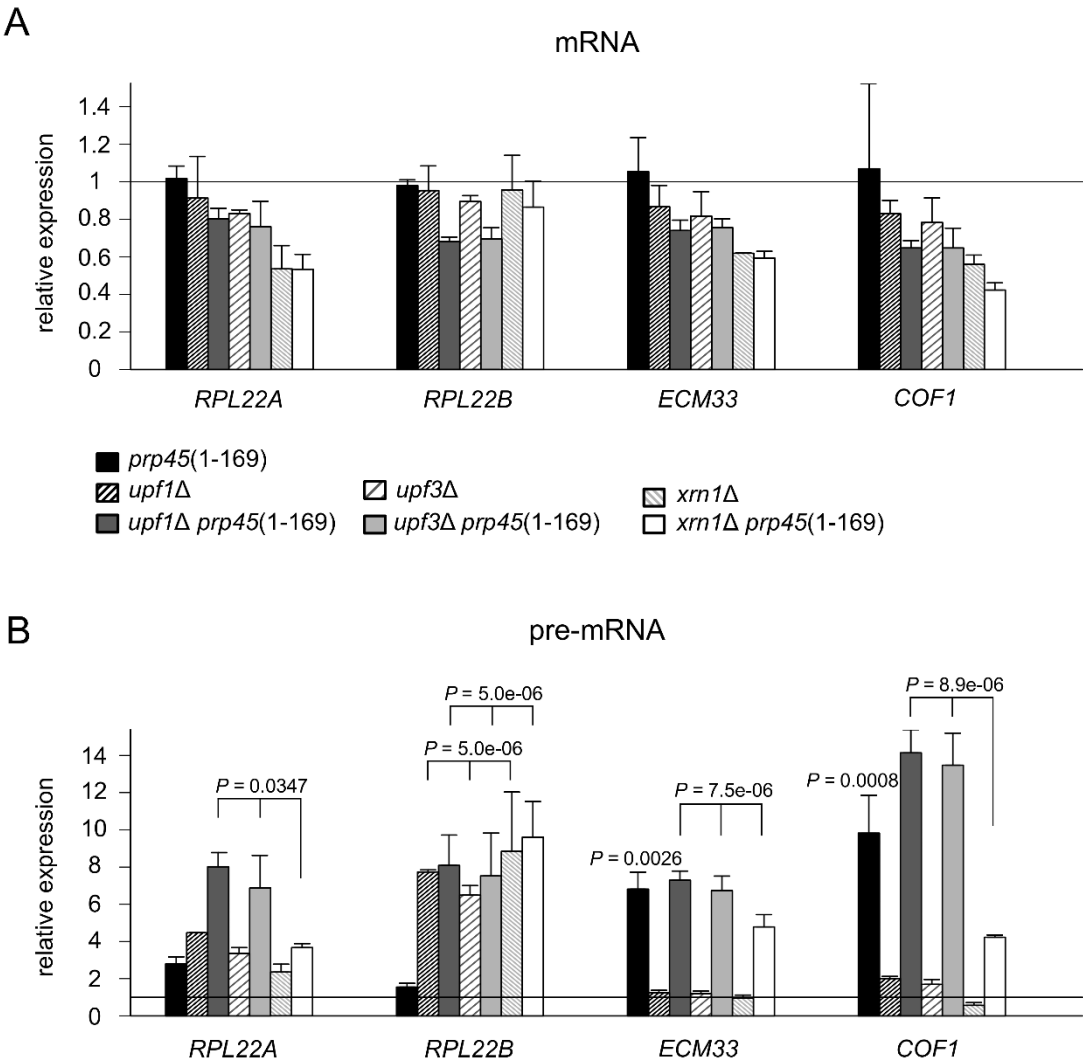
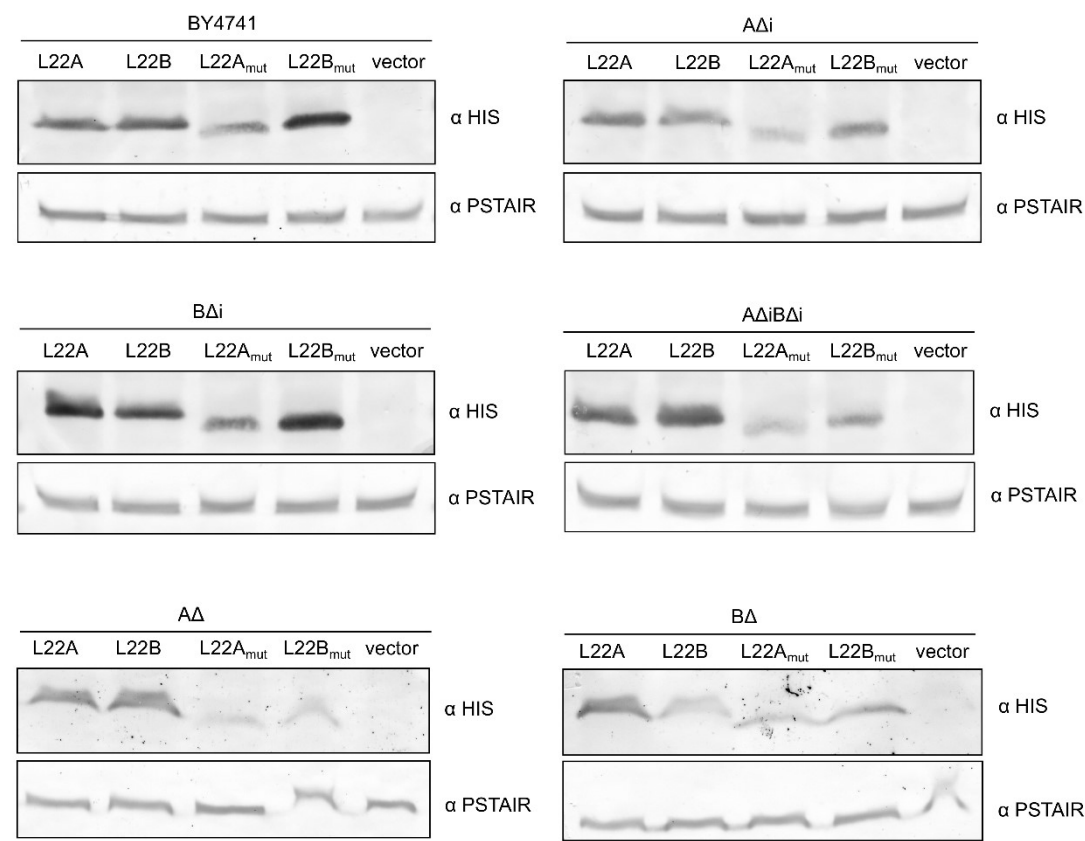


Fig. S5

A



B

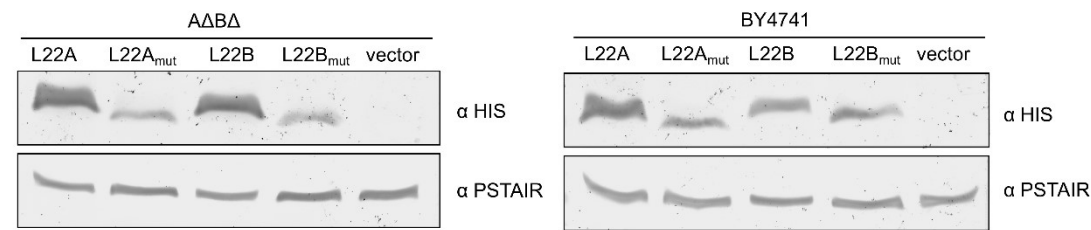
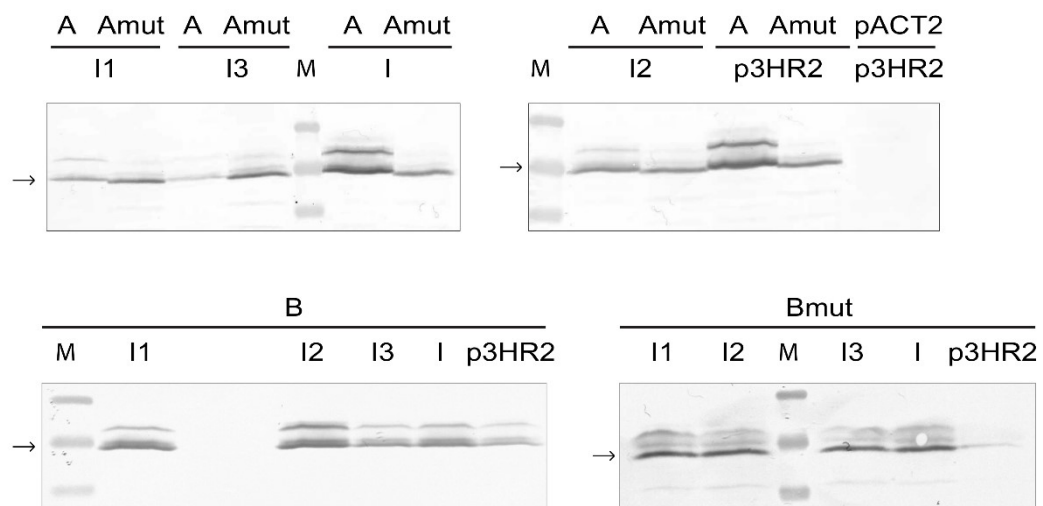


Fig. S6



Ostatní doplňkový (supplementary) materiál je dostupný online na <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0190685#sec026> a obsahuje položky shrnuté na stranách 198 a 199 této práce.